

**EVALUACIÓN TEMPORAL DE LA PROTEÍNA PRECURSORA AMILOIDE  
POSTERIOR A UN TRAUMA CRANEOENCEFÁLICO UTILIZANDO UN  
CULTIVO ÓRGANOTÍPICO AGUDO EN UN MODELO MURINO.**

**GLORIA ESPERANZA ALDANA CASTILLO**



**CENTRO DE ESTUDIOS CEREBRALES  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS (7670)  
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS - FACULTAD DE SALUD  
UNIVERSIDAD DEL VALLE**

**2015**

**EVALUACIÓN TEMPORAL DE LA PROTEÍNA PRECURSORA AMILOIDE  
POSTERIOR A UN TRAUMA CRANEOENCEFÁLICO UTILIZANDO UN  
CULTIVO ÓRGANOTÍPICO AGUDO EN UN MODELO MURINO.**

**GLORIA ESPERANZA ALDANA CASTILLO**

**Trabajo de Investigación presentado como requisito para optar al título de  
Magíster en Ciencias Biomédicas**

**Mauricio Palacios Gómez – Director**

**Martha Isabel Escobar – Asesor**

**Efraín Buriticá – Asesor**

**CENTRO DE ESTUDIOS CEREBRALES**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS (7670)**

**ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS - FACULTAD DE SALUD**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE**

**2015**

## ***A mi familia...***

*“La vida no es ningún pasillo recto y fácil  
que recorremos libres y sin obstáculos,  
sino un laberinto de pasadizos,  
en el que tenemos que buscar nuestro camino,  
perdidos y confusos, detenidos,  
de vez en cuando, por un callejón sin salida.*

*Pero, si tenemos fe, siempre se abre  
una puerta ante nosotros;  
quizá no sea la que imaginamos,  
pero sí será, finalmente,  
la que demuestre ser buena  
para nosotros”*

**A.J. CRONIN**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, en especial a mi Madre y Mi Abuela, por enseñarme que las dificultades son posibilidades de salir adelante y que con perseverancia todos nuestros propósitos pueden hacerse realidad, además de su incondicional apoyo en este largo camino de aprender.

Al Doctor Mauricio Palacios, quien más que un tutor, ha sido un apoyo constante durante un largo proceso de formación académica y personal.

A los Doctores Martha Escobar y Hernán Pimiento, por permitirme ser parte de su grupo de investigación, apoyarme y orientarme en este camino de las neurociencias.

Al Profesor Efraín Buriticá por guiarme y acompañarme en las labores investigativas en el laboratorio, ya que sin él no tendría las herramientas necesarias para defenderme y hacer lo que más me gusta: Investigar.

A Martha Lucia Ceballos y Nhora Holguín, que me ayudaron en todo momento y por supuesto, por sus innumerables enseñanzas y paciencia en el ámbito investigativo

A las Profesoras Liliana Salazar y Carolina Pustovrh, por los aportes significativos que realizaron a mis múltiples dudas metódicas.

A mis compañeros del Centro de Estudios Cerebrales Daniel Romero, Einer Muñoz, Diana González, Nelson Villalba, Lucas Posada, Olga Gaitán y Lina Vanessa Becerra, por sus explicaciones y apoyo en los procedimientos experimentales y conceptuales.

A Jaime Muñoz y al Dr. Oscar Gutiérrez, ya que me guiaron en mi investigación y me permitieron contar con su laboratorio de cultivos celulares.

A Sirsa Hidalgo por toda su ayuda en el Bioterio.

A María Cristina Del Castillo, Diego Zubieta e Iván Darío Zapata, ya que fueron mi motor de arranque en esta etapa de mi vida.

A todas aquellas personas que de una u otra forma aportaron su granito de arena en esta etapa de mi vida (secretarias, técnicos, compañeros y profesores)

A la Universidad del Valle, por brindarme la posibilidad de estudiar en la mejor para los mejores y su incalculable aporte a mi formación académica.



## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Trauma Craneoencefálico .....	3
1.2 Modelo experimental de lesión .....	5
1.3 Cultivos Organotípicos Agudos .....	6
1.4 Viabilidad y Recuento Celular.....	7
1.5 Proteína Precursora Amiloide (APP).....	8
1.6 Antígeno Nuclear Neuronal (NeuN) .....	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
3. OBJETIVOS .....	15
3.1 Objetivo General .....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
4.1 Consideraciones Éticas .....	16
4.2 Diseño Experimental .....	16
4.3 Modelo De Lesión.....	17
4.4 Preparación De Las Tajadas .....	20
4.5 Cultivo Organotípico Agudo .....	21
4.6 Procesamiento De Muestras.....	22
4.6.1 Recuento y Viabilidad Celular .....	22
4.6.2 Inmunohistoquímica .....	25
4.6.3 Registro y Procesamiento De Imágenes .....	26
4.7 Análisis de Datos y Estadística .....	28
5. RESULTADOS .....	29
5.1 Modelo de Lesión.....	29
5.2 Recuento y Viabilidad Celular.....	30

5.3	NeuN.....	31
5.3.1	Datos Descriptivos de la expresión de NeuN .....	31
5.3.2	Datos cuantitativos de la expresión de NeuN .....	49
5.4	Proteína precursora Amiloide (APP), extremo N-terminal .....	60
5.4.1	Datos Descriptivos de la expresión de APP N-terminal .....	60
5.4.2	Datos Cuantitativos de la expresión de APP N-terminal.....	74
5.5	Proteína precursora Amiloide (APP), extremo C-terminal .....	86
5.5.1	Datos Descriptivos de la expresión de APP C-terminal .....	86
6.	DISCUSIÓN .....	88
7.	CONCLUSIONES.....	100
8.	PERSPECTIVAS.....	101
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	102
<b>ANEXO 1.</b>	<b>PROTOCOLO ANESTESIA .....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO 2.</b>	<b>PROTOCOLO MODELO DE LESIÓN.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO 3.</b>	<b>PROTOCOLO VIABILIDAD CELULAR.....</b>	<b>116</b>
<b>ANEXO 4.</b>	<b>PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO 5.</b>	<b>COMPARACIÓN MÚLTIPLE IR NeuN 48 HORAS .....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO 6.</b>	<b>COMPARACIÓN MÚLTIPLE IR NeuN 72 HORAS .....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO 7.</b>	<b>COMPARACIÓN MÚLTIPLE IR APP N-TERMINAL 48 HORAS .....</b>	<b>120</b>
<b>ANEXO 8.</b>	<b>COMPARACIÓN MÚLTIPLE IR APP N-TERMINAL 72 HORAS .....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO 9.</b>	<b>APROBACIÓN Y CERTIFICACIÓN - COMITÉ ÉTICA ANIMAL .....</b>	<b>122</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Procesamiento proteolítico de APP. ....	10
<b>Figura 2.</b> Esquema del modelo de impacto-aceleración de Marmarou. ....	19
<b>Figura 3.</b> Esquema del dispositivo de Impacto. ....	19
<b>Figura 4.</b> Baño de cultivo organotípico modificado de Krimer y Goldman-Rakle...21	
<b>Figura 5.</b> Distribución del tejido dentro de la cámara de cultivo. ....	22
<b>Figura 6.</b> Cámara de Neubauer improved (Boeco Germany) ....	23
<b>Figura 7.</b> Cámara de Neubauer. ....	24
<b>Figura 8.</b> Esquema de conteo. ....	24
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de Viabilidad celular ....	30
<b>Figura 10.</b> Organización laminar de la corteza motora; NeuN-IR – 48 horas post-TCE.....	32
<b>Figura 11.</b> Organización laminar de la corteza motora; NeuN-IR – 72 horas post-TCE.....	33
<b>Figura 12.</b> Organización laminar de la Corteza Sensorial; NeuN-IR – 48 horas post-TCE.....	34
<b>Figura 13.</b> Organización laminar de la Corteza Sensorial; NeuN-IR – 72 horas post-TCE.....	35
<b>Figura 14.</b> Densidad neuronal en Estriado. NeuN-IR – 48 horas post-TCE .....	36
<b>Figura 15.</b> Densidad neuronal en Estriado. NeuN-IR – 72 horas post-TCE .....	37
<b>Figura 16.</b> Densidad neuronal en Corteza Olfatoria. NeuN-IR – 48 horas post-TCE .....	38
<b>Figura 17.</b> Densidad neuronal en Corteza Olfatoria. NeuN-IR – 72 horas post-TCE.....	39
<b>Figura 18.</b> Densidad neuronal en Hipocampo – CA3. NeuN-IR – 48 horas post-TCE.....	40
<b>Figura 19.</b> Densidad neuronal en Hipocampo – CA3. NeuN-IR – 72 horas post-TCE.....	41
<b>Figura 20.</b> Densidad neuronal en Hipocampo – CA1. NeuN-IR – 48 horas post-TCE: A. Control 0 hr. cultivo. B. Trauma 0 hr. cultivo. C. Trauma 2 hr. cultivo. D. Trauma 4 hr. cultivo. E. Trauma 6 hr. cultivo. F. Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X.....	42
<b>Figura 21.</b> Densidad neuronal en Hipocampo – CA1. NeuN-IR – 72 horas post-TCE.....	43
<b>Figura 22.</b> Densidad neuronal en Hipocampo – HILUS. NeuN-IR – 48 horas post-TCE.....	44

<b>Figura 23.</b> Densidad neuronal en Hipocampo – HILUS. NeuN-IR – 72 horas post-TCE.....	46
<b>Figura 24.</b> Densidad neuronal en Hipocampo – Giro Dentado. NeuN-IR – 48 horas post-TCE.....	47
<b>Figura 25.</b> Densidad neuronal en Hipocampo – Giro Dentado. NeuN-IR – 48 horas post-TCE.....	48
<b>Figura 26.</b> Análisis bivariado: Inmunoreactividad NeuN Vs. Tiempo de cultivo .....	58
<b>Figura 27.</b> Prueba post hoc de Tukey .....	59
<b>Figura 28.</b> APP N-terminal; Corteza Motora - 48 horas post-TCE .....	61
<b>Figura 29.</b> APP N-terminal; Corteza Motora - 72 horas post-TCE .....	62
<b>Figura 30.</b> APP N-terminal; Corteza Sensorial - 48 horas post-TCE .....	63
<b>Figura 31.</b> APP N-terminal; Corteza Sensorial - 72 horas post-TCE .....	64
<b>Figura 32.</b> APP N-terminal; Hipocampo – CA3 – 48 horas post-TCE.....	65
<b>Figura 33.</b> APP N-terminal; Hipocampo – CA3 – 72 horas post-TCE.....	66
<b>Figura 34.</b> APP N-terminal; Hipocampo – CA1 – 48 horas post-TCE.....	67
<b>Figura 35.</b> APP N-terminal; Hipocampo – CA1 – 72 horas post-TCE.....	69
<b>Figura 36.</b> APP N-terminal; Hipocampo – HILUS – 48 horas post-TCE.....	70
<b>Figura 37.</b> APP N-terminal; Hipocampo – HILUS – 72 horas post-TCE.....	71
<b>Figura 38.</b> APP N-terminal; Hipocampo – Giro Dentado – 48 horas post-TCE.....	72
<b>Figura 39.</b> APP N-terminal; Hipocampo – Giro Dentado – 72 horas post-TCE.....	73
<b>Figura 40.</b> Análisis bivariado: Inmunoreactividad APP N-terminal Vs. Tiempo de cultivo .....	84
<b>Figura 41.</b> Prueba post hoc de Tukey .....	85
<b>Figura 42.</b> APP C-terminal; Cuerpo Calloso. ....	87
<b>Figura 43.</b> Máquina y Cámara de anestesia. ....	114

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> ANOVA a dos vías. CA3 - NeuN.....	50
<b>Tabla 2.</b> ANOVA a dos vías. CA1 - NeuN.....	51
<b>Tabla 3.</b> ANOVA a dos vías. Hilus – NeuN.....	52
<b>Tabla 4.</b> ANOVA a dos vías. Giro Dentado - NeuN.....	53
<b>Tabla 5.</b> ANOVA a dos vías. Corteza Motora – NeuN .....	54
<b>Tabla 6.</b> ANOVA a dos vías. Corteza Sensorial – NeuN .....	56
<b>Tabla 7.</b> ANOVA a dos vías. CA3 – APP N-terminal .....	75
<b>Tabla 8.</b> ANOVA a dos vías. CA1 – APP N-terminal .....	76
<b>Tabla 9.</b> ANOVA a dos vías. Hilus – APP N-terminal .....	78
<b>Tabla 10.</b> ANOVA a dos vías. Giro Dentado – APP N-terminal .....	79
<b>Tabla 11.</b> ANOVA a dos vías. Corteza Motora – APP N-terminal .....	81
<b>Tabla 12.</b> ANOVA a dos vías. Corteza Sensorial – APP N-terminal .....	82

## LISTA DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Cálculo de células/ml.....	24
<b>Ecuación 2.</b> Cálculo % de viabilidad celular .....	25
<b>Ecuación 3.</b> Cálculo de la Inmunoreactividad por densidad óptica relativa.....	27

## RESUMEN

El trauma craneoencefálico (TCE), es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en individuos menores de 45 años en el mundo. El TCE puede desencadenar una gran variedad de complicaciones como epilepsia, Alzheimer, Parkinson, alcoholismo, depresión, psicosis, suicidio, trastornos neuroendocrinos, disfunción sexual, incontinencia entre otros.

Para comprender los mecanismos fisiopatológicos del TCE y su evolución; dos grupos de animales fueron sometidos a TCE empleando una versión modificada del modelo de impacto-aceleración por caída libre de peso de Marmarou y otros dos grupos de animales fueron utilizados como controles los cuales fueron sometidos al mismo procedimiento quirúrgico pero sin lesión. Los animales fueron sacrificados después de un tiempo de supervivencia de 48 y 72 horas y las muestras obtenidas fueron llevadas a cultivo durante 5 tiempos (0, 2, 4, 6 y 8 horas). Posteriormente, estas muestras fueron evaluadas con técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas.

A nivel comportamental no se observaron alteraciones motoras después del trauma. El análisis histológico con el anticuerpo anti-NeuN mostró que existe pérdida neuronal en los sujetos lesionados. A las 4 horas de cultivo alrededor del 60% de células en los sujetos control y casi un 50% de células en sujetos lesionados, siguen siendo viables. Tanto en los sujetos control como en los sujetos lesionados, se encontró marcación aumentada del extremo N-terminal de APP en la corteza y en el hipocampo en los diferentes tiempos de cultivo. Sin embargo, este aumento fue mayor en los sujetos lesionados. El extremo C-terminal de APP sólo fue encontrado a las 6 y 8 horas de cultivo en sujetos lesionados.

**PALABRAS CLAVE:** Cultivo organotípico agudo, proteína precursora amiloide, APP, trauma craneoencefálico, TCE, viabilidad celular

## **ABSTRACT**

Traumatic brain injury (TBI) is a major cause of morbidity and mortality in individuals younger than 45 years in the world. TBI can trigger a variety of complications such as epilepsy, Alzheimer's, Parkinson's, alcoholism, depression, psychosis, suicide, neuroendocrine disorders, sexual dysfunction, incontinence and others.

The understanding of TCE pathophysiological mechanisms and its evolution; two groups of animals were subjected to TCE using a modified version of the model of impact-accelerated free fall weight Marmarou and two other groups of animals were used as controls which underwent the same surgical procedure but without injury. The animals were sacrificed after a survival time of 48 and 72 hours and the samples were cultured at 0, 2, 4, 6 and 8 hours. Subsequently, these samples were evaluated with histochemical and immunohistochemical techniques.

A behavioral level there were no motor disturbances after trauma. Histological analysis with anti-NeuN antibody showed that there is neuronal loss in the injured subjects. After 4 hours of culture about 60% of cells in controls and almost 50% of cells in injured subjects remain viable. Both, control subjects and injured subjects, showing an increase in the tagging of N-terminal APP in the cortex and hippocampus with different culture times. However, this increase was greater in subjects injured. The C-terminus of APP was found only at 6 and 8 hours of culture in injured subjects.

**KEYWORDS:** Acute organotypic culture, amyloid precursor protein, APP, traumatic brain, TCE, cell viability.



## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Trauma Craneoencefálico**

El trauma craneoencefálico (TCE), es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en individuos menores de 45 años en el mundo y, a menudo, conlleva a una severa discapacidad. <sup>1</sup> Al menos 10 millones de traumatismos cerebrales graves que se presentan anualmente pueden resultar en muerte u hospitalización. Un estimado de 57 millones de personas en todo el mundo son hospitalizadas con una o más lesiones cerebrales traumáticas; sin embargo, la proporción de pacientes con discapacidad relacionada con TCE es desconocida. <sup>2</sup>

En Estados Unidos, en promedio 1.4 millones de TCE ocurren al año, lo cual incluye 235.000 pacientes hospitalizados por lesiones cerebrales traumáticas no mortales; 1.1 millones de visitas a urgencias y aproximadamente 50.000 muertes. <sup>2</sup>

En Colombia, la principal causa de TCE son los accidentes de tránsito los cuales aportan un 22% al total de muertes por causa violenta, siendo la población entre 20 y 59 años, (población laboralmente activa) la más vulnerable y que genera graves implicaciones socioeconómicas e impacta negativamente la dinámica familiar. <sup>3</sup>

La lesión cerebral traumática se define como la lesión del cerebro que conduce a muerte neuronal y por ende, a alteraciones temporales o permanentes, que conllevan a secuelas neuropsiquiátricas o funcionales, las cuales han sido reportadas en pacientes que han sobrevivido a una lesión traumática. A su vez, los efectos de vivir con estas secuelas, influyen en gran medida en la calidad de vida de estas personas y de sus cuidadores. Este tipo de lesión cerebral se deriva de la interacción entre un individuo y fuerzas externas, como consecuencia del impacto,

una rápida aceleración o desaceleración, un objeto penetrante o una onda explosiva, entre otros. La naturaleza, intensidad, dirección y duración de estas fuerzas determinan la evolución y la magnitud de los daños.<sup>4 5 6</sup>.

Además, el trauma craneoencefálico es considerado como un factor de riesgo epidemiológico para la enfermedad de Alzheimer<sup>7-10</sup> junto con un otros predisponentes aceleradores genéticos que incluyen el genotipo ApoE.<sup>11</sup> Esta afirmación se refuerza en los hallazgos neuropatológicos que reportan placas amiloides corticales difusas en un 30 a 38% de las personas menores de 50 años que han sufrido TCE severo.<sup>12</sup> Los mecanismos moleculares de la formación de la placa amiloide en trauma no están completamente esclarecidos, pero parecen incluir alteraciones en la producción y/o metabolismo de la proteína precursora amiloide (APP), la cual se encuentra sobre expresada en axones y somas de neuronas lesionadas post TCE.

Esta complejidad y heterogeneidad del TCE en humanos ha conducido al diseño de una gran variedad de modelos experimentales, cada uno de los cuáles reproduce un aspecto concreto del daño observado en la clínica.<sup>13</sup> Algunos modelos reproducen fundamentalmente lesiones cerebrales focales<sup>14 15 16</sup> mientras que otros reproducen un daño cerebral difuso.<sup>17 18</sup>

Estos modelos experimentales han permitido analizar múltiples parámetros tanto fisiológicos, neuroquímicos, patológicos o de conducta cuyas modificaciones se hallan asociadas al desarrollo y progresión de cada tipo de lesión cerebral post-traumática.<sup>19</sup>

Para el presente estudio se considerará estratégica la evaluación de la proteína precursora amiloide (APP) mediante un modelo experimental de lesión sumado a la utilización de un cultivo organotípico agudo debido a que aunque hay

numerosos reportes en la literatura clínica que demuestran un importante depósito de  $\beta$ -Amiloide y la formación de placas amiloides,<sup>20</sup> no se ha demostrado una relación directa entre el aumento de depósito de  $\beta$ -Amiloide y su toxicidad en TCE.<sup>21</sup> El aumento de APP en la secuencia experimental planteada podría aportar sobre la función de esta proteína y su valor como marcador de neurodegeneración o neuroprotector.

## **1.2 Modelo experimental de lesión**

Para este proyecto se utilizó el modelo de impacto-aceleración, diseñado por Marmarou; el cual fue desarrollado en roedores para reproducir la lesión cerebral difusa que suele estar presente en pacientes que han sufrido un TCE grave tras un impacto cerrado sobre el cráneo.<sup>22</sup> La mayor ventaja de este modelo es que reproduce tanto el edema como la lesión axonal difusa (LAD), sin asociar contusiones focales ni la rotura permanente de la barrera hematoencefálica.<sup>23 24 25</sup>

Con este modelo también se pueden producir lesiones cerebrales de diferente intensidad dependiendo de la masa y la altura desde la que cae libremente la pesa.<sup>22</sup> Un impacto producido con una pesa de 450 g desde 2 m de altura se considera grave y está asociado a una mortalidad del 44% (en animales con ventilación espontánea) y a una incidencia de fracturas craneales de 12.5%. Puesto que la muerte se debe a un fallo respiratorio, probablemente secundaria al fallo transitorio de las funciones del tallo cerebral, la mortalidad se reduce a un 10% cuando las ratas se ventilan mecánicamente. Sin embargo la mortalidad en la modalidad de TCE leve (caída de la pesa desde 1 m de altura) es muy reducida.

La LAD se debe a la lesión de los axones por el trauma, que produce un fallo en el transporte axonal.<sup>26</sup> Cuando la intensidad del trauma es leve se observa inflamación axonal que sólo produce una disfunción de la conducción nerviosa,

mientras que si es moderada o severa, se produce un estiramiento y daño estructural de los axones con desconexión axonal.<sup>27</sup>

Este tipo de lesión, LAD, es muy frecuente en la mayoría de los accidentes de tráfico debido al desplazamiento que sufre la cabeza con respecto al cuello. Las fuerzas de inercia ocasionan un movimiento rápido de la cabeza que conlleva a una distribución variable de las tensiones dentro del cerebro, lo que causará una distorsión y estiramiento del tejido cerebral.<sup>28</sup>

### 1.3 Cultivos Organotípicos Agudos

Los cultivos organotípicos son tajadas o rebanadas de tejidos cultivados enteros, sin disociación de las células individuales, donde la población heterogénea de células que se encuentran *in vivo* se mantienen *in vitro* conservando su organización citoarquitectónica tridimensional.<sup>29 30</sup> Este tipo de preparación permite un buen acceso experimental, manteniendo un preciso control de las condiciones extracelulares como la nutrición (líquido ceforraquídeo de preparación artificial), la oxigenación (suplemento gaseoso donde predominan las combinaciones de dióxido de Carbono al 5% y Oxígeno al 95%) y la temperatura.<sup>31</sup> El principal objetivo en los cortes agudos cerebrales es reproducir lo más fielmente posible las condiciones *in vivo* e *in situ* para hacer descripciones agudas de los procesos.

Entre sus ventajas están la facilidad técnica, economía de recursos, mayor experiencia en su uso y amplio conocimiento de sus propiedades<sup>29</sup>; al conservar la interacción entre tipos celulares distintos alcanzándose una mejor observación *ex vivo* con respecto a los fenómenos *in situ*.<sup>32 33 34 35</sup>

En los últimos años se ha incrementado el uso de cultivos organotípicos, derivados principalmente de rata, para evaluar neurodegeneración, especialmente

a partir de cortes de hipocampo. Estos son de gran utilidad, por ejemplo, en el estudio de lesión por hipoxia/hipoglicemia describiendo los tipos de muerte asociados y permitiendo el ensayo de compuestos farmacológicos en varios sectores de tejido simultáneamente.<sup>35</sup> En la investigación de TCE, se han desarrollado modelos de inducción del trauma primario y secundario en preparaciones hipocampales de ratas de hasta dos semanas de edad<sup>36</sup> y se han utilizado en la comprensión de la fisiopatología,<sup>37 38</sup> y la evaluación de medicamentos.<sup>39 40</sup> La respuesta del tejido a los fármacos en estas preparaciones se aproximan más a la situación real.<sup>36 41</sup>

Las desventajas de este sistema es que no todas las áreas del cerebro son fáciles de cultivar, el tejido ideal es aquel que tiene una estructura en capas que pueden ser alineados en paralelo al plano de corte de las tajadas y que está muy bien limitados por el espesor de la propia división. Las tajadas de tejido con muchas proyecciones fuera del plano generan una pérdida neuronal masiva y una reorganización de los circuitos.<sup>31</sup> Otra dificultad es la viabilidad de los cultivos que provienen de tejido adulto el cual se estima en un 5-10%; además normalmente, el tiempo de vida de una tajada cerebral, bien sea de rata o ratón, es de 6 a 12 horas en cultivos organotípicos agudos.<sup>42 43 44</sup>

#### **1.4 Viabilidad y Recuento Celular**

La estimación rápida y precisa de la viabilidad celular, es vital para el cultivo exitoso de células y tejidos. La viabilidad celular suele definirse como el número de células sanas en una muestra. A menudo, los mismos ensayos utilizados para determinar la viabilidad celular, son utilizados durante un periodo de tiempo para investigar la proliferación celular dentro de una población. Entre los principales métodos utilizados para evaluar la viabilidad celular, se encuentra el ensayo de exclusión con azul de tripan.

La membrana plasmática de las células vivas excluye a la mayoría de las moléculas hidrofóbicas. Sin embargo, las células que poseen lesiones en dicha membrana, permiten la entrada al citoplasma de moléculas hidrofóbicas, como el colorante azul de tripan. Por lo tanto, este ensayo se basa en la exclusión de dicho colorante: si las células se encuentran vivas no permiten el ingreso del mismo, mientras que células muertas o en proceso de muerte son permeables al colorante. <sup>45</sup>

Estos ensayos requieren que las células se encuentren en una sola suspensión celular, para luego poder ser visualizadas y contadas bajo un microscopio utilizando un hematocitómetro, el cual maneja volúmenes definidos, o utilizando un dispositivo automatizado de conteo. A partir de estos conteos, es relativamente simple calcular el número total de células y el porcentaje de células viables dentro de una población de interés. <sup>46</sup>

La importancia de realizar estos ensayos de viabilidad y recuento de células, radica en que permite evaluar la respuesta celular a las condiciones de un medio, ya sea en ensayos *ex vivo*, *in vitro* e incluso cultivos organotípicos. La eficacia de los cultivos celulares se determina teniendo en cuenta la respuesta a la lesión, en un medio con condiciones ideales para su crecimiento y desarrollo, y nos proporciona el mejor método para el mantenimiento celular. <sup>47</sup>

## **1.5 Proteína Precursora Amiloide (APP)**

La proteína precursora amiloide (APP) fue descubierta hace más de 25 años, sin embargo su papel a nivel celular sigue siendo incierto. <sup>48</sup> La APP pertenece a una familia de proteínas de membrana Tipo I la cual también incluye a las proteínas APL-1 en *C. elegans*, APPL en *Drosophila* y APLP1 y APLP2 en mamíferos, y es codificada por un gen localizado en el cromosoma 21, en la región 21q 11.2-q21.1; presentando las características estructurales de las proteínas de membrana: un

largo segmento extracelular amino-terminal y un corto segmento intracelular carboxilo-terminal <sup>49</sup>

La APP posee tres isoformas: las isoformas APP(751) y APP(770) de 751 y 770 aminoácidos respectivamente, las cuales se expresan predominantemente en células gliales, plaquetas y en tejido periférico, y la isoforma APP(695) de 695 aminoácidos que se expresa principalmente y en grandes cantidades en neuronas. <sup>50 51</sup> Esta proteína es precursora del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), el principal componente proteínico de las placas amiloides en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer <sup>52 53</sup>

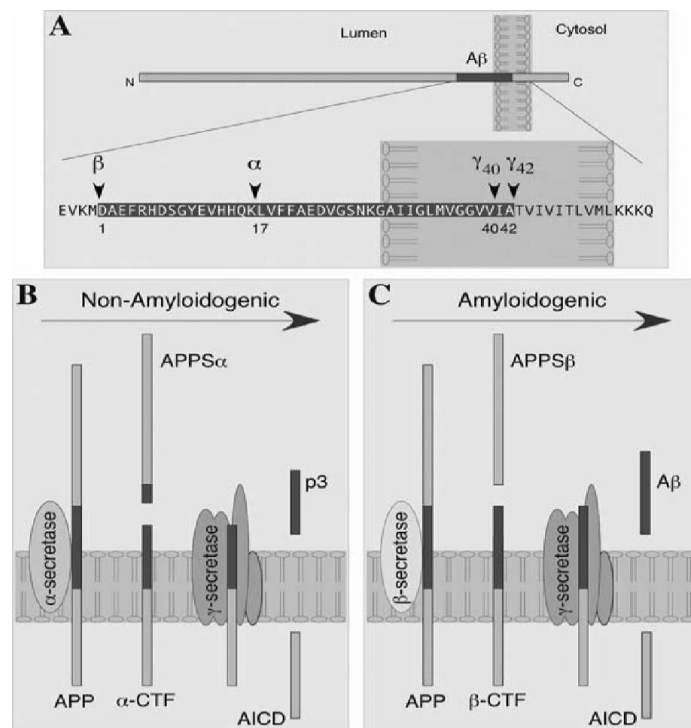
La APP puede sufrir dos formas alternativas de procesamiento liberando fragmentos casi idénticos a excepción de unos pocos aminoácidos. Este procesamiento es mediado por tres enzimas: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ) secretasas. Estas tres enzimas distinguen dos vías principales para su procesamiento siendo una de estas vías la que en última instancia es responsable de la formación de las placas amiloides. <sup>54</sup>

La  $\alpha$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa forma el sAPP $\alpha$ , y se ha informado que muchas de las funciones neuroprotectoras y neurotróficas en el sistema nervioso central se deben a este péptido soluble <sup>55</sup>; mientras que  $\beta$ -APP y  $\beta$ -Amiloide son generados a partir de la escisión por  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa. La  $\alpha$ -secretasa participa en la vía no-amiloidogénica en el que la mayoría de las APP se procesan, mientras que la vía  $\beta$ -secretasa es responsable de producir el  $\beta$ -Amiloide. Ambas vías son mutuamente excluyentes. <sup>56</sup> (Figura 1).

La expresión aumentada de APP es un evento temprano durante la lesión secundaria del TCE, su acumulación axonal se ha reportado a partir de los 35 minutos después de la lesión, <sup>57</sup> y se ha reportado como hallazgo de autopsias de

humanos con antecedentes de TCE y en modelos animales que persiste en concentraciones altas a través del tiempo.<sup>9</sup>

En contraste con los posibles efectos perjudiciales de la APP, el aumento agudo de APP post TCE ha resultado en la hipótesis de que la APP puede realmente tener una función neuroprotectora.<sup>58</sup> APP tiene una función neurogénica y sinaptogénica durante el desarrollo, se sintetiza por una vía ribosomal de baja energía poco habitual en la síntesis de proteínas que es propia de proteínas de respuesta al estrés metabólico y se ha descrito su capacidad de bloquear caspasa 3 activada y P-53. APP puede resultar beneficiosa o perjudicial dependiendo de la forma en que se procese dentro de las células.



**Figura 1.** Procesamiento proteolítico de APP. **A.** Estructura de APP, se muestra el dominio Aβ sombreado y ampliado. Se indican los principales sitios de escisión por α-, β- y γ-secretasas. **B.** Vía no amiloidogénica de APP, se refiere al procesamiento secuencial de APP por α- y γ-secretasas unidas a membrana. La α-secretasa corta dentro del dominio Aβ, impidiendo la generación del péptido Aβ intacto. **C.** Vía amiloidogénica de APP, el procesamiento de APP es llevado a cabo por acción secuencial de β- y γ-secretasas unidas a membrana. (Tomado de Thinakaran et al., 2007)<sup>54</sup>



## 1.6 Antígeno Nuclear Neuronal (NeuN)

El Antígeno Nuclear Neuronal (NeuN) es una proteína soluble que se une al DNA de la mayoría de las poblaciones neuronales de roedores, salamandras, pollos y humanos; además, se sabe actualmente que NeuN es Fox-3, una proteína involucrada en la regulación del empalme alternativo del RNA mensajero. Fox-3 contiene un motivo de reconocimiento de RNA en la parte media de la molécula y es muy probable que se una específicamente al elemento UGCAUG. Este elemento está sobre representado en los intrones en los que el empalme es regulado de una manera dependiente del tipo celular y de la etapa de desarrollo, en comparación con los intrones empalmados constitutivamente. Por lo tanto, Fox-3 podría actuar como un factor determinante de la especificidad neuronal durante el empalme, sugiriéndose así un posible rol de esta molécula en la diferenciación de células neurales y en el desarrollo del sistema nervioso.<sup>59,60</sup>

El anticuerpo contra esta proteína reconoce diferentes tipos neuronales en todas las regiones del sistema nervioso (corteza cerebral, núcleos de la base, hipocampo, tálamo, cerebelo, etc.). Aunque el antígeno es detectable en el citoplasma incluyendo la región proximal de procesos dendríticos, la inmunoreactividad es mayor en el núcleo, con ligera o nula marcación del nucléolo,<sup>60</sup> siendo este patrón similar en la gran mayoría de neuronas que son positivas para NeuN, sin embargo existen algunas excepciones como las células de Cajal-Retzius, las células de Purkinje, las neuronas del núcleo dentado en el cerebelo, las neuronas del núcleo olivar inferior en el bulbo raquídeo, las neuronas fotorreceptoras retinianas, las células mitrales del bulbo olfatorio, las células de la cadena ganglionar simpática y las interneuronas cerebelosas, las cuales comprenden a las células en cesta, las células estrelladas, las células de Golgi, las células unipolares en forma de brocha y las células fusiformes; tampoco ningún tipo de célula glial presenta inmunoreactividad para este marcador.<sup>60 61 62</sup>

La intensidad de la marcación o expresión de NeuN varía ampliamente entre tipos celulares y entre regiones subcelulares, reflejando diferencias de estados de actividad celular.<sup>63</sup> En neuronas normales que no han sido sometidas a ningún tipo de estrés o lesión, marcadas con NeuN por lo general expresan una inmunoreactividad intensa y aparentemente muy estable en el tiempo.<sup>64</sup> Además, al ser un marcador que permite apreciar la organización laminar y la diversidad morfológica de subpoblaciones neuronales, es un buen referente para definir pérdida celular después de una lesión.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El trauma craneoencefálico se ha definido como *“una lesión del cerebro causada por una fuerza externa que puede producir estados disminuidos o alterados de conciencia, lo cual se traduce en una capacidad cognitiva o funcionamiento físico alterado”*

El TCE puede desencadenar una gran variedad de complicaciones, siendo esta la principal causa de epilepsia <sup>65 61</sup>; se asocia a su vez con un mayor riesgo de padecer algunas condiciones médicas como: enfermedad de Alzheimer <sup>66</sup>, enfermedad de Parkinson <sup>67</sup>, alcoholismo <sup>68</sup>, depresión <sup>69 70</sup>, psicosis <sup>71 72</sup>, suicidio <sup>73</sup>, trastornos neuroendocrinos <sup>74</sup>, disfunción sexual e incontinencia <sup>75</sup>, incrementa la mortalidad a largo plazo y reduce la expectativa de vida <sup>76 77</sup>, entre otros. La prevalencia en Colombia de secuelas por TCE es de 6.4 por 1000 habitantes <sup>2</sup>, el cual significa un problema de salud pública de mayor magnitud que en EE. UU., del orden de 2.7 por 1000 habitantes <sup>6</sup>.

El modelo de Marmarou adoptado en la realización de este proyecto, permite obtener y observar la mayoría de los cambios patológicos ocurridos por TCE difuso y se considera que se obtiene una mayor aproximación a la heterogeneidad del trauma que se aprecia en humanos; adicionalmente, gracias a su costo-efectividad y fácil diseño se ha convertido en uno de los modelos más utilizados.

Sumado a esto, la aplicación de cultivos organotípicos agudos, los cuales ofrecen las ventajas de conservación de las conexiones celulares tejido-específicas, es decir, permite preservar en parte los circuitos neuronales locales con los patrones de innervación apropiada, pero excluyendo parámetros complejos de los modelos animales, como la irrigación sanguínea y la barrera hematoencefálica, permite la supervivencia del tejido al menos por unas cuantas horas y de esta forma se

podría conseguir un abordaje más cercano a los mecanismos fisiopatológicos relacionados con el TCE y su evolución.

Entre estos mecanismos fisiopatológicos surge la importancia de evaluar la expresión temporal de la proteína precursora amiloide (APP) ya que se ha reportado que la expresión de APP es potenciada por diversas formas de lesión cerebral, incluyendo al trauma craneoencefálico, y atribuyéndose la síntesis de esta proteína a neuronas, macrófagos, microglía o astrocitos; sin embargo poco se ha reportado sobre el comportamiento temporal y espacial de esta proteína en un modelo de lesión axonal difusa con posibilidad de seguimiento evolutivo, de tal forma que se pueda establecer como una herramienta experimental valiosa en el estudio de fármacos neuroprotectores en trauma craneoencefálico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Describir los cambios temporales en la expresión de la proteína precursora amiloide (APP) después del trauma craneoencefálico, en un modelo de cultivo órganotípico agudo de corteza cerebral de rata

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar la viabilidad del cultivo órganotípico agudo de corteza cerebral de rata con trauma craneoencefálico
- Establecer los cambios espaciales en la expresión inmunohistoquímica de la proteína precursora amiloide (APP) después de trauma craneoencefálico, en un modelo de cultivo órganotípico agudo de corteza cerebral de rata
- Describir la evolución temporal y espacial de la población neuronal en un modelo de cultivo órganotípico agudo de corteza cerebral de rata con trauma craneoencefálico.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Consideraciones Éticas**

Este estudio se realizó en concordancia con la Ley 84 sancionada por el congreso de Colombia el 27 de diciembre de 1989, *“Por la cual se adopta el estatuto Nacional de Protección de los Animales”*, la cual en su capítulo sexto hace referencia a los animales de experimentación y la Resolución 8430 de 1993 emitida por el Ministerio de Salud sobre Protección de Animales *“Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”*.

Los experimentos referidos a continuación fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, según el Acta No. 001 de 2011, dentro del marco del Proyecto *“Modelo De Cultivo Organotípico Agudo De Cerebro De Rata Para La Evaluación De Medicamentos Neuroprotectores En Trauma Cráneo Encefálico”* (Ver Anexo 9) y además se siguieron las guías locales de manejo de animales de experimentación.

### **4.2 Diseño Experimental**

Se utilizaron 40 ratas (*Rattus norvegicus*) cepa *Wistar* provenientes del Bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle.

Para minimizar un posible sesgo debido a variaciones entre individuos, se seleccionaron machos de aproximadamente 12 semanas de edad, con un peso promedio entre 350 y 450 g aproximadamente, los cuales fueron asignados aleatoriamente a 4 grupos experimentales (2 grupos lesionados y 2 grupos control) con un  $n = 10$  ratas/grupo:

**GRUPO A:** TCE 48 horas + Cultivo organotípico agudo      **GRUPO C:** TCE 72 horas + Cultivo organotípico agudo

**GRUPO B:** Control 48 horas + Cultivo organotípico agudo      **GRUPO D:** Control 72 horas + Cultivo organotípico agudo

Los animales de los grupos A y C se sometieron a un modelo de trauma craneoencefálico, mientras que los animales de los grupos B y D fueron utilizados como control de los efectos metodológicos no específicos (anestesia y cirugía)

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación bajo anestesia general y las muestras obtenidas fueron llevadas a cultivo organotípico agudo durante 5 tiempos de cultivo (0, 2, 4, 6 y 8 horas), donde se asignaron dos animales de cada grupo experimental (A, B, C y D) para cada tiempo de cultivo de forma aleatoria.

#### **4.3 Modelo De Lesión**

Se utilizó el modelo de caída libre de peso diseñado por A. Marmarou <sup>22</sup> modificando tanto la cepa de las ratas como la altura a la cual cae el peso para realizar el impacto.

Previo estandarización realizada por el grupo permitió determinar la altura utilizada en nuestro modelo (1.55 mt) <sup>78</sup> siendo una altura que se encuentra en el rango en el que el modelo original define el trauma causado como moderado (trauma leve con un peso de 450 gr a 1 metro de altura, moderado con un peso de 450 gr de 1 a 2 mt, y severo con un peso de 500 gr a 2,1 metros de altura), garantizando una sobrevivencia del 100% sin requerimientos de ventilación mecánica en ratas *Wistar* con un peso corporal promedio superior a 350 gr.

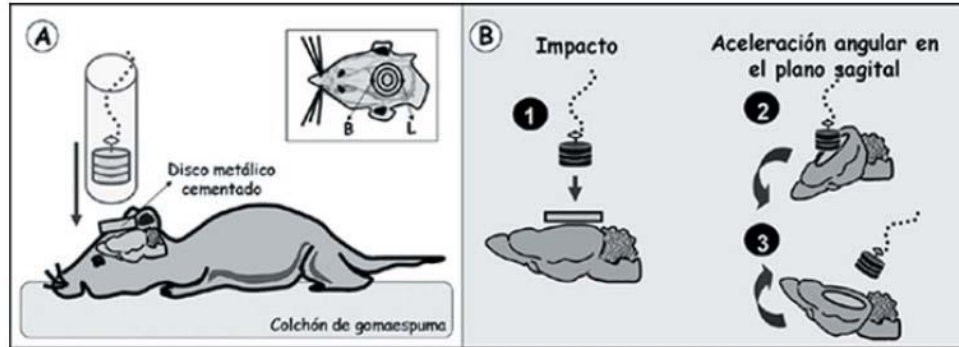
Para este modelo, las ratas fueron anestesiadas con Isoflurano antes del impacto (Ver Protocolo, Anexo 1). Posteriormente, una pesa de 450 gr se dejó caer libremente desde una altura de 1.55 mt a través de un tubo de Plexiglas sobre un disco metálico de 2.5 cm de diámetro y 2 mm de grosor fijado con adhesivo de cianoacrilato al cráneo de una rata (sobre la línea media del cráneo entre bregma y lambda) la cual descansa sobre un colchón de goma-espuma de densidad 20 kg/m<sup>3</sup>. (Figura 2) (Ver Protocolo, Anexo 2). Después del impacto, los animales se mantuvieron con anestesia durante un periodo de recuperación de 15 min y no se les suministró analgésicos debido a que podían ser factores distractores (neuroprotectores o neurolesivos) de los resultados finales del modelo. Los subgrupos usados como controles, fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico, en el que se siguieron los mismos pasos descritos previamente, excepto que la pesa no se dejó caer sobre sus cabezas.

Posterior al periodo de recuperación, todos los animales fueron llevados de nuevo al Bioterio de la Universidad del Valle, donde se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas: Alojamiento en jaulas individuales de policarbonato ANCARE, 12/12 horas luz/oscuridad, Temperatura entre 18 – 22 °C, Humedad Relativa entre 45 – 70%, y se les suministró agua y alimento estándar balanceado Lab Diet 5001 (Composición bioquímica: Proteínas 28,5%, Grasa 13,4%, Carbohidratos 57,9%)

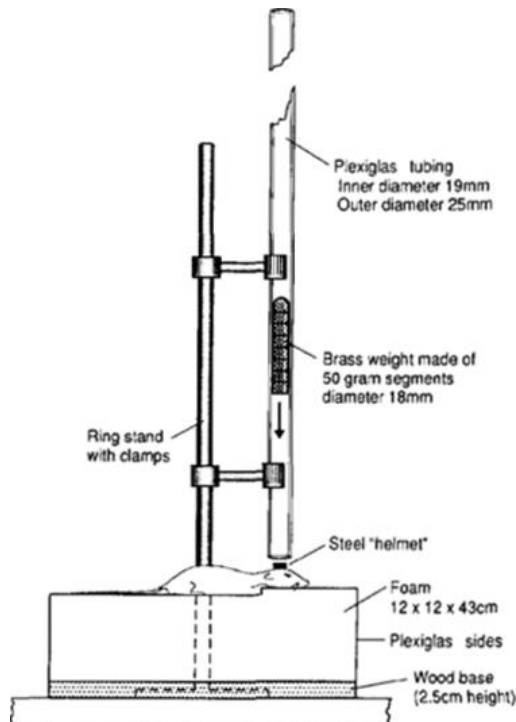
El objetivo del tubo es permitir un ángulo controlado de la caída del objeto, con un recorrido preestablecido; el disco tiene como función distribuir la fuerza mecánica del impacto sobre todo el cráneo, con el fin de disminuir el riesgo de fracturas y lesiones focales. (Figura 3) La cabeza de la rata al apoyarse sobre un colchón de goma espuma permite un determinado movimiento de la cabeza sobre el impacto, que produce una aceleración angular rápida en el plano sagital, determinando las



fuerzas de aceleración y desaceleración, que sufre el cerebro dentro del cráneo y son responsables de la lesión producida.



**Figura 2.** Esquema del modelo de impacto-aceleración de Marmarou. A) En primer lugar se coloca un disco metálico sobre el cráneo de la rata, centrado en la línea media entre bregma y lambda. A continuación se coloca el animal sobre una espuma y con la cabeza centrada bajo un tubo de aluminio por el que se deja caer una pesa para que golpee el disco metálico. B) La cabeza de la rata sufre un impacto seguido de una aceleración angular en el plano sagital. (Tomado de Prieto et al., 2009)<sup>79</sup>.



**Figura 3.** Esquema del dispositivo de Impacto. Se observa la disposición de la rata sobre un colchón de goma-espuma de densidad  $20 \text{ kg/m}^3$  y bajo el tubo de plexiglas a través del cual se deja caer una pesa de 450 gr, desde una altura de 1.55 mt.

Durante todo el procedimiento quirúrgico, se evaluaron diferentes aspectos como estado de alerta o anestesia, respuesta motora y respiración teniendo en cuenta los siguientes criterios:

El estado de alerta se evaluó mediante la respuesta al pinzamiento distal de la cola, clasificado como 1) anestesia profunda (sin reflejos cutáneos, de retirada de la pata o cola), 2) alertamiento leve (reflejo de retirada de la cola) y 3) alertamiento completo (retirada enérgica de cola, ambas patas y contracción de músculos abdominales), así como la respuesta motora por observación de vueltas espontáneas ipsilaterales (0 ausente-3 presente y continuo) y retracción de patas traseras durante la marcha. En la respiración se tuvo en cuenta si se presentaron periodos de apnea tras el impacto.<sup>80,81</sup>

#### **4.4 Preparación De Las Tajadas**

Las ratas de los grupos A y B fueron sacrificadas 48 horas después del trauma controlado, mientras que los grupos C y D fueron sacrificados 72 horas después de la cirugía.

Bajo anestesia general (Ver Protocolo, Anexo 1), se sacrificaron los animales por decapitación. Se extrajo el cerebro y se realizaron cortes coronales en sentido rostro – caudal descartando el bulbo olfatorio y el cerebelo, obteniendo tajadas de 1.5 mm de grosor.

Posteriormente, bajo condiciones de esterilidad y a temperatura ambiente se retiraron coágulos y meninges de las muestras obtenidas y se les mantuvo bañadas en Líquido ceforraquídeo artificial (LCRa) (NaCl 124 mM, KCl 5mM,  $\text{NH}_2\text{PO}_4$  1,24 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,3 mM,  $\text{NaHCO}_3$  26 mM,  $\text{CaCl}_2$  2mM, y glucosa 10 mM) a pH controlado de 7,4.<sup>33</sup> En todos los casos, se evitó el exceso de

manipulación con el fin de no lesionar el tejido. Estas tajadas fueron llevadas de inmediato a cultivo.

#### 4.5 Cultivo Organotípico Agudo

Las tajadas se cultivaron en una interfase entre LCRA y carboxígeno ( $O_2$  al 95% y  $CO_2$  al 5%) , a 36 °C y pH fisiológico (64) en una cámara para cultivo organotípico agudo, modificada a la descrita por Krimer y Goldman-Rakic <sup>82</sup>, y que ha sido previamente detallada en nuestro grupo <sup>83</sup> El LCRA se recambió por un flujo continuo de 2ml/min y el carboxígeno se suministró en burbujeo permanente de 0,5L/min. (Figuras 4 y 5)

Los tiempos de cultivo establecidos para todos los grupos (A, B, C y D) fueron 2, 4, 6 y 8 horas; para lo cual se realizó un registro cada 15 minutos de los diferentes parámetros con el fin de verificar que el flujo de  $O_2/CO_2$ , LCRA y temperatura fueran los adecuados durante estos tiempos de cultivo.

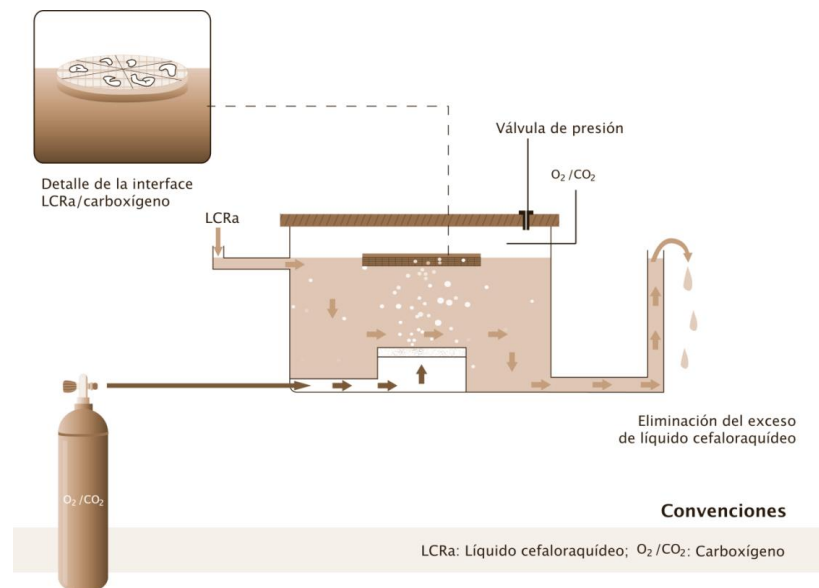


Figura 4. Baño de cultivo organotípico modificado de Krimer y Goldman-Rakle.



**Figura 5.** Distribución del tejido dentro de la cámara de cultivo.

## 4.6 Procesamiento De Muestras

De cada muestra, TCE o CONTROL de 48 y 72 horas que fueron cultivadas, se obtuvieron cuatro tajadas de 1000  $\mu\text{m}$  cada una, las cuales se distribuyeron así:

- 1 tajada con corteza motora se destinó para ensayos de Viabilidad Celular. Este procedimiento sólo se llevó a cabo en los sujetos con supervivencia de 48 horas.
- 3 tajadas con corteza motora, sensorial e hipocampo; se destinaron para fijación (Inmunohistoquímica)

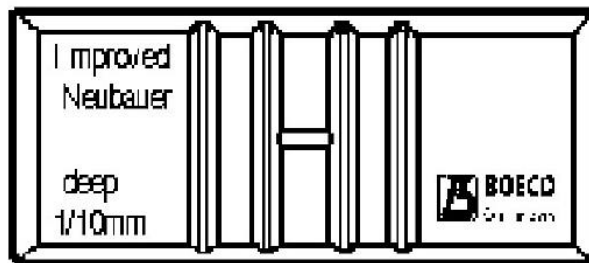
### 4.6.1 Recuento y Viabilidad Celular

La tajada o corte coronal obtenido a partir de cada sujeto (control o trauma) de los diferentes tiempos de cultivo, para el grupo post-trauma de 48 horas y que fue destinado para el ensayo de Viabilidad Celular, fue procesado de la siguiente forma:

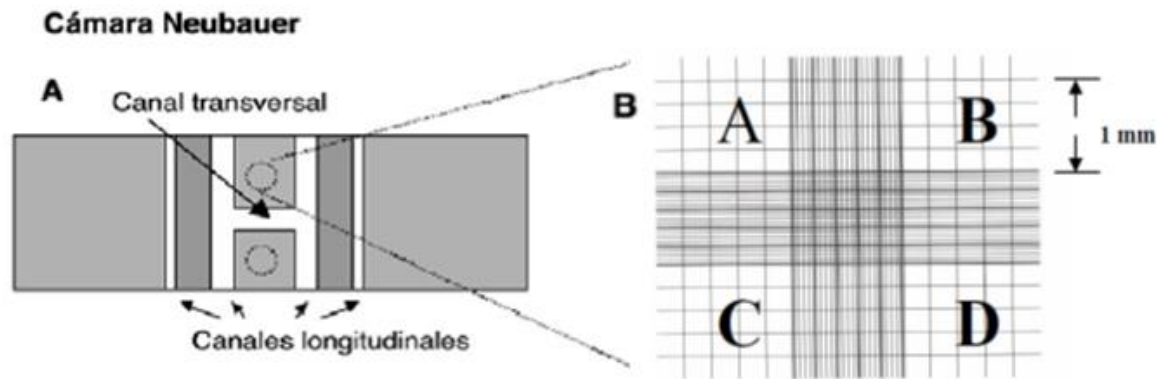
Se separaron ambos hemisferios. El hemisferio izquierdo se destinó para cultivo y el Hemisferio Derecho se mantuvo durante los mismos tiempos (0, 2, 4, 6 y 8 horas) en una solución de LCRA, a pH 7.4 y 25 °C.

El recuento celular y la evaluación de viabilidad celular se realizó en un hematocitómetro o cámara de Neubauer improved (Boeco Germany) (Figura 6) al cual se adicionó una mezcla de solución celular con azul de tripan sobre el portaobjetos y la muestra se cubrió con un cubreobjetos. La lectura se hizo con un microscopio de luz.

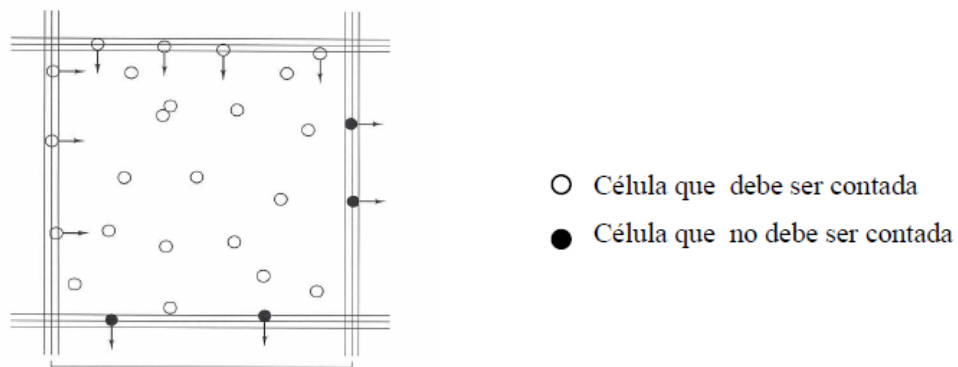
Una vez enfocada la cuadrícula, se contaron las células que habían en los recuadros divididos en 16 cuadrículas (A, B, C y D) (Figura 7) y se tuvo en cuenta tanto las células blancas (vivas) como las azules (muertas); descartando aquellas que no estuviesen dentro de la cuadrícula de conteo. (Figura 8). Todos los conteos para cada una de las muestras se realizaron por duplicado. (Ver Protocolo, Anexo 3)



**Figura 6.** Cámara de Neubauer improved (Boeco Germany)



**Figura 7.** Cámara de Neubauer. A. Esquema de la cámara dónde se observan los dos compartimientos de conteo. B. Amplificación de una cámara del hematocitómetro y su respectiva cuadrícula grabada. En los cuatro cuadrantes marcados como A, B, C y D se realizaron los conteos celulares.



**Figura 8.** Esquema de conteo. Aquí se representan qué células deben ser contadas y cuáles no.

Para el recuento y el cálculo de la viabilidad celular, se tuvieron en cuenta las siguientes ecuaciones:

- **Recuento Celular:**

$$\frac{\# \text{ Células Contadas} \times \text{Dilución}}{\# \text{ Cuadrantes Contados} \times \text{Profundidad de la Cámara}}$$

**Ecuación 1.** Cálculo de células/ml

- **Viabilidad Celular:**

$$\frac{\# \text{ Células Vivas}}{\text{Total Células Contadas (vivas + muertas)}} \times 100$$

**Ecuación 2.** Cálculo % de viabilidad celular

#### **4.6.2 Inmunohistoquímica**

Las muestras fueron fijadas durante 3 días mediante inmersión en pH 7,4 a 4 grados Celsius. Seguido a esto, se realizó crioprotección con gradientes de sacarosa al 10%, 20% y 30% en PBS 1X por 3 días consecutivos y se congelaron por inmersión en isopentano enfriado previamente en hielo seco y se almacenaron a -70 °C.

En un criostato Leica CM3050-S, se realizaron cortes coronales de 30 µm de las tajadas congeladas. De cada muestra de tejido se descartaron las primeras y últimas 200 µm para evitar las áreas afectadas por la disección y por el contacto con la malla de soporte al interior de las cámaras de cultivo. Los cortes se almacenaron en solución anticongelante a -20 °C que fueron procesados histológicamente.

Las muestras se procesaron consecutivamente para Inmunohistoquímica en tejido flotante contra los anticuerpos primarios, usando la técnica de avidina/biotina anti-ratón y anti-conejo; y revelado con diaminobencidina contrastado con níquel, bajo condiciones estándar de laboratorio. (Ver Protocolo, Anexo 4)

Para evaluar la especificidad en la inmunotinción, un ensayo de control negativo fue ejecutado omitiendo el anticuerpo primario. El control negativo mostró ausencia de inmunoreactividad en los tejidos.

#### **4.6.3 Registro y Procesamiento De Imágenes**

Todas las microfotografías se realizaron con la cámara digital DFC 295 (Leica) acoplada a un microscopio Leica DM750 iluminado por LED.

Las capturas se realizaron con el programa Leica Application suite 3.8.0 en formato Tiff de 8 bits, tipo entero sin signo, con una resolución de 2048 x 1536 pixeles. En todas estas fotografías se fijó un tiempo de exposición de 22.5 ms, manteniendo constante la intensidad de la iluminación y sin corrección gamma.

Para determinar la organización laminar en las muestras, tanto en tejido TCE como en tejido control, las placas histológicas se observaron al microscopio de luz y se tomaron microfotografías en el aumento de 10x de al menos 3 cortes de la corteza somato sensorial. Las secciones a fotografiar debieron mostrar el borde pial además de una pequeña porción de sustancia blanca subcortical. Se realizó la reconstrucción fotográfica del espesor total de la corteza, a partir de la fusión de fotografías consecutivas con la asistencia del programa PhotoStitch de Cannon (versión 3.1.21.45, 1996-2007®).

Para el conteo celular, cálculo de la IR y descripciones, se tomaron microfotografías en el aumento de 20x y 40x de corteza motora, sensorial e hipocampo de cada hemisferio. Las microfotografías para el conteo celular correspondieron a las láminas supragranulares e infragranulares justo en las zonas de transición de las láminas II-III y V-VI respectivamente. Todas estas microfotografías fueron calibradas previamente al análisis.

Los conteos en corteza se realizaron manualmente, por dos observadores en un cuadrante con un área de 500 x 500  $\mu\text{m}^2$ , el cual se ubicó en la transición entre las láminas II-III y V-VI.



En la determinación de la IR, tanto la región de interés como el *background* se delinearon a mano. El área seleccionada como *background* fue representativa del *background* presente en la imagen, y en especial en la región de interés.

La cuantificación de la IR en el hipocampo fue evaluada mediante valores de densidad óptica relativa (ROD, por sus siglas en inglés) para la región de interés. Estos valores se obtienen después de aplicar una transformación no lineal a los valores de pixeles empleando la fórmula:  $ROD = \log(255/\text{valor promedio de los pixeles})$ . En la ecuación 3, los valores ROD para la región de interés han sido corregidos por *background*.

$$IR_{ROD} = \log\left(\frac{\overline{VP}_{background}}{\overline{VP}_{roi}}\right) \times 1000$$

**Ecuación 3.** Cálculo de la Inmunoreactividad por densidad óptica relativa

**Dónde:**

$IR_{ROD}$  = Inmunoreactividad por densidad óptica relativa

$\overline{VP}_{roi}$  = Valor promedio de los pixeles para la región de interés

$\overline{VP}_{background}$  = Valor promedio de los pixeles para el *background*

En las imágenes digitales para la inmunohistoquímica, un valor de pixel bajo (menos luz atravesando la muestra) se relaciona con una mayor expresión de la proteína bajo análisis, es por eso que el concepto de densidad óptica (o absorbancia), que indica (se relaciona linealmente con) la concentración de moléculas absorbentes de luz (en nuestro caso la proteína de interés) cobra utilidad aquí. Además, el rango del histograma de pixeles de nuestras imágenes para inmunohistoquímica fue amplio, justificando así la transformación no lineal de los datos. <sup>84</sup>

Todos los análisis de imágenes se realizaron con el programa ImageJ 1.48 NIH, USA; ([http://rsb.info.nih.gov/ij/.](http://rsb.info.nih.gov/ij/))

#### **4.7 Análisis de Datos y Estadística**

Se realizó un análisis descriptivo y cuantitativo de la marcación por Inmunohistoquímica para APP N-terminal y NeuN en las regiones analizadas. Para APP C-terminal sólo se realizaron análisis descriptivos.

Para el análisis cuantitativo se tuvieron en cuenta los 4 grupos experimentales establecidos y en todos se midió la expresión de las proteínas NeuN y APP N-terminal en los diferentes tiempos de cultivo para lo cual se construyeron dos curvas (Control Vs. Tratado) y se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas, considerando a priori, una  $p < 0.05$  como indicador de significancia del resultado.

Se utilizó la prueba post hoc de Tukey para la comparación múltiple de medias entre los grupos y para cada uno de los niveles del cultivo. Los análisis y las gráficas estadísticas se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism 6.

El reporte de resultados que se muestra a continuación, se realizó teniendo en cuenta los lineamientos dados por el NC3RS - National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research en su guía ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments). (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>)

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Modelo de Lesión**

Los 20/40 biomodelos que fueron sometidos a impacto sobrevivieron a éste y no presentaron fractura de cráneo. Todos fueron incluidos en los análisis posteriores.

Posterior al impacto, los animales fueron ingresados nuevamente a la cámara de anestesia para mantenimiento y monitoreo y es posible que se hayan presentado eventos de apnea con una duración menor a 4 segundos. Durante la fase de mantenimiento, los biomodelos exhibieron un patrón irregular de respiración con duración de entre 5 y 15 minutos. No se presentaron convulsiones dentro del tiempo de monitoreo post-lesión y tampoco manifestaron signos de decorticación. Después de la recuperación de la anestesia, periodo que tuvo una duración promedio de 10 minutos (tiempo un poco mayor para el grupo trauma en comparación con el grupo control), los biomodelos despertaron completamente y en ninguno se evidenció déficit motor, sin embargo, algunos pocos casos presentaron hipoactividad. Las anteriores características permitieron clasificar la lesión generada por nuestro modelo, como moderada.

Es importante señalar que todos los animales después de haber sido sometidos al procedimiento quirúrgico, tanto lesionados como controles, continuaron con su dieta normal y no presentaron disminución de peso. Tampoco presentaron complicaciones respiratorias en los días posteriores.

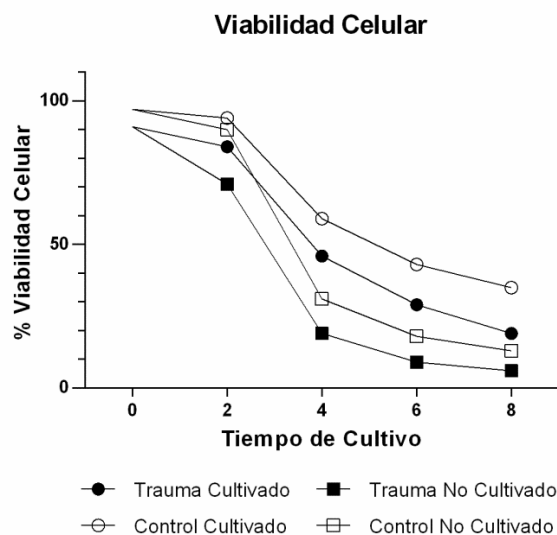
Los cerebros de los animales sometidos a trauma, no presentaron contusiones o lesiones focales; sin embargo, no se pudo evaluar la presencia de hematomas epidurales, subdurales o subaracnoideos. Los cerebros correspondientes al tiempo 0 (cero) horas, los cuales no fueron cultivados, no presentaron ningún tipo de hemorragia.

## 5.2 Recuento y Viabilidad Celular

El ensayo por exclusión con azul de tripan permitió cuantificar el número de células vivas y muertas en cada una de las muestras provenientes de los grupos A y B, las cuales fueron sometidas a dos tratamientos (cultivo y no cultivo) a lo largo de todos los tiempos de cultivo.

A partir de este recuento, se determinó la viabilidad celular (ecuación 2) de las muestras cultivadas y no cultivadas, encontrándose para ambos tratamientos que el porcentaje de viabilidad celular fue mayor en los sujetos control Vs. los sujetos lesionados; sin embargo este porcentaje fue superior en las muestras cultivadas comparado con las muestras que no se cultivaron.

Se observa además que a las 4 horas de cultivo, alrededor del 60% de células en los sujetos control y casi un 50% de células en los sujetos lesionados, siguen siendo viables en el tejido cultivado; a diferencia del tejido que no fue cultivado en el que se encontró que a las 4 horas hay un porcentaje de viabilidad mucho menor al 50%. (Figura 9)



**Figura 9.** Porcentaje de Viabilidad celular en muestras cultivadas y no cultivadas

## **5.3 NeuN**

### **5.3.1 Datos Descriptivos de la expresión de NeuN**

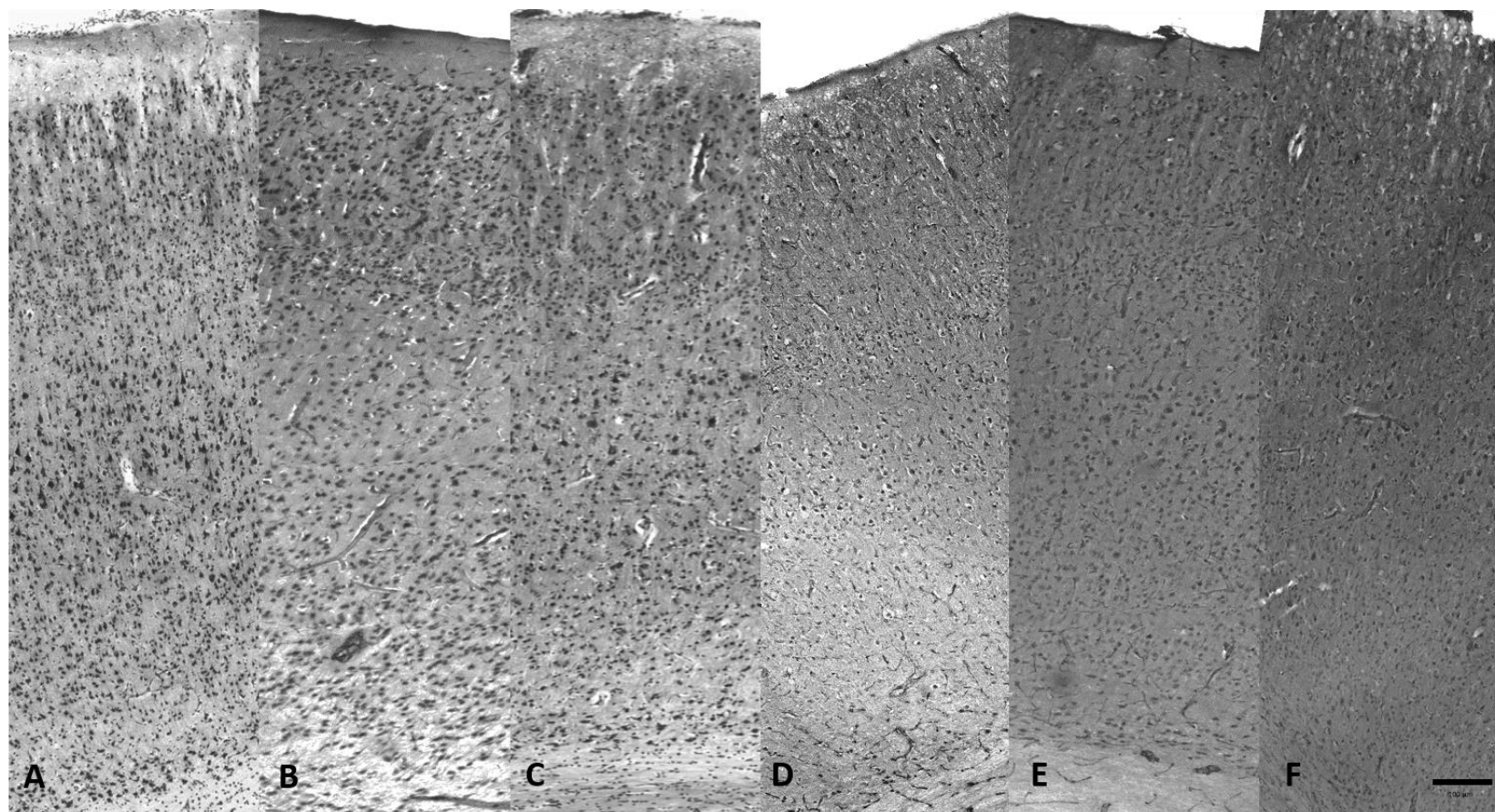
Esta marcación se caracterizó por presentar una intensa Inmunoreactividad principalmente en el núcleo de las células, extendiéndose a las regiones proximales de las dendritas apicales y basales.

Con las muestras correspondientes a los grupos B y D o grupos Control al tiempo correspondiente a las 0 horas y marcadas contra NeuN, se identificaron las 6 láminas corticales, y a partir de ellas se estableció un patrón de comparación para evaluar la evolución de la lesión en los grupos experimentales tanto en corteza motora como corteza sensorial a las 48 y 72 horas post-trauma. (Figuras 10, 11, 12 y 13).

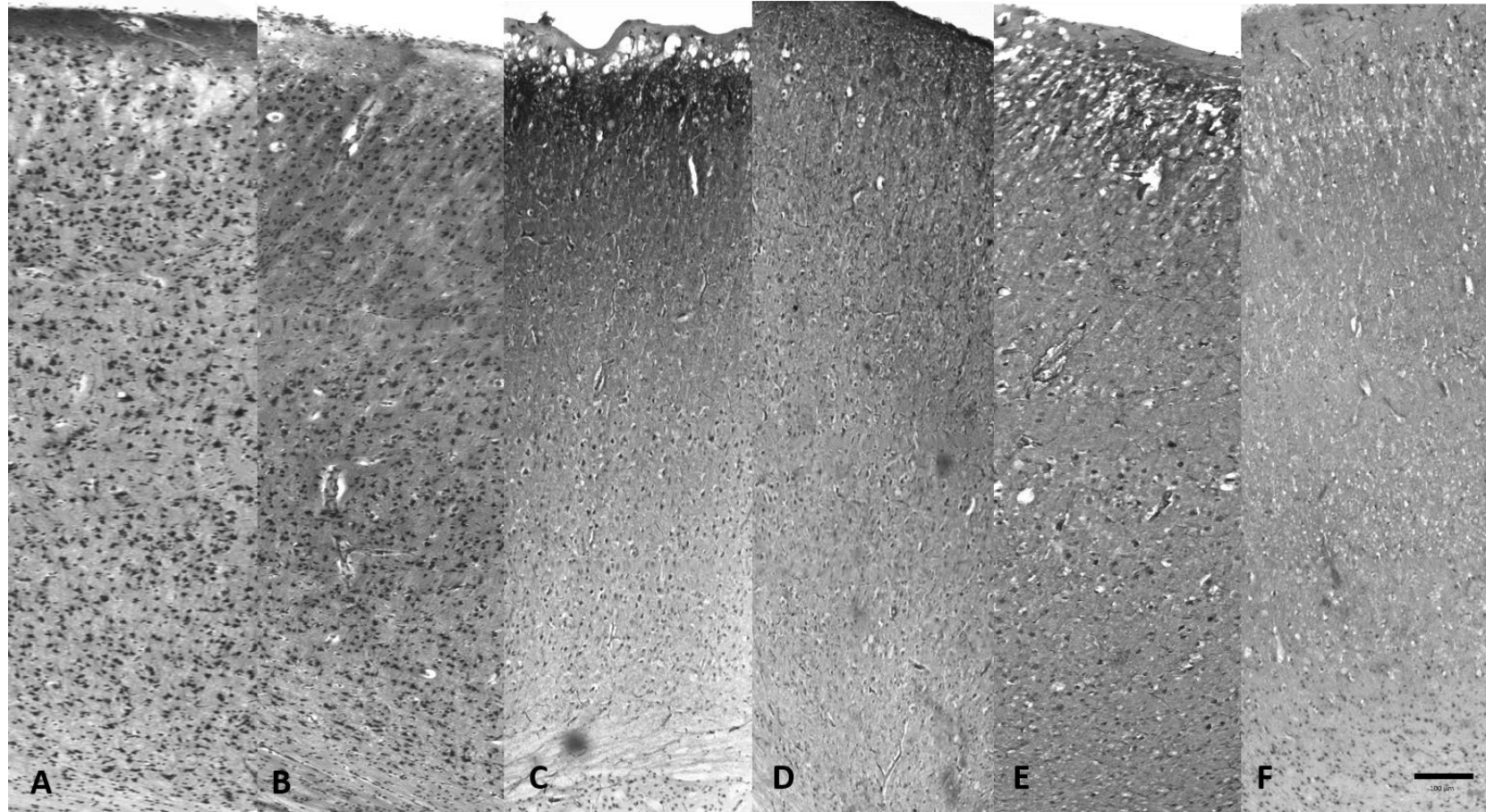
También se observaron células positivas para NeuN, de tamaño pequeño; en el estriado y corteza olfatoria primaria. (Figuras 14, 15, 16 y 17)

Para evaluar la evolución de la lesión en el hipocampo a lo largo de los diferentes tiempos de cultivo, se dividió para su análisis, en 4 estructuras las cuales son: CA1, CA3, Giro Dentado e Hilus. (Figuras 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25)

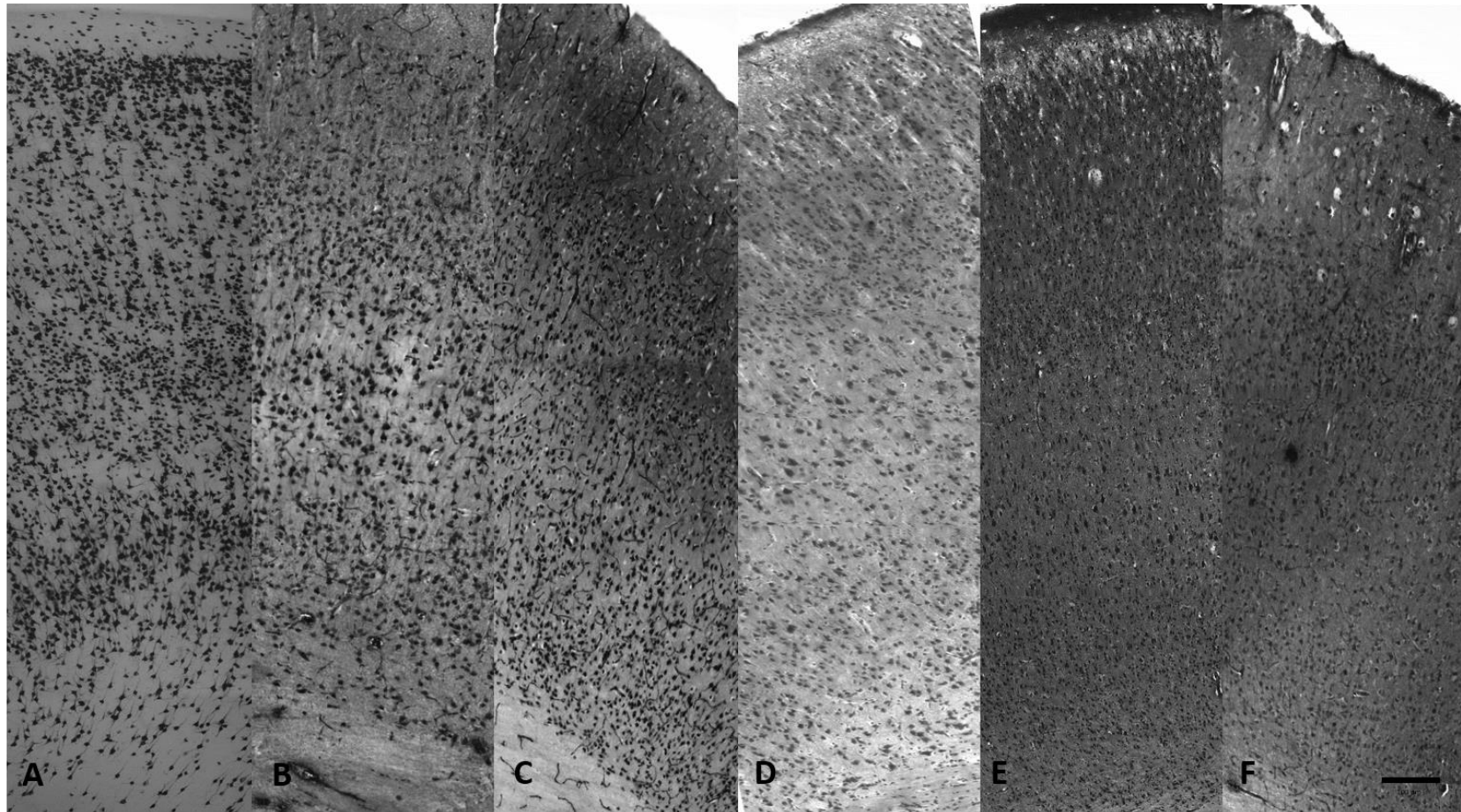
En general, se logró observar una alta Inmunoreactividad para NeuN, permitiendo observar una alta densidad neuronal de morfología variada, la cual sin embargo va decreciendo a lo largo de los diferentes tiempos de cultivo.



**Figura 10.** Organización laminar de la Corteza Motora; NeuN-IR – 48 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. Se observa una marcación intensa, abundante cantidad de células positivas y la clara distinción de los límites laminares. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. Se observa mucha semejanza con el control en la cantidad de células y en la calidad de IR, sin embargo, se puede apreciar una reducción en la cantidad de células positivas. A partir de este tiempo se muestra claramente la pérdida celular que se va presentando a lo largo de los diferentes tiempos de cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100 µm.

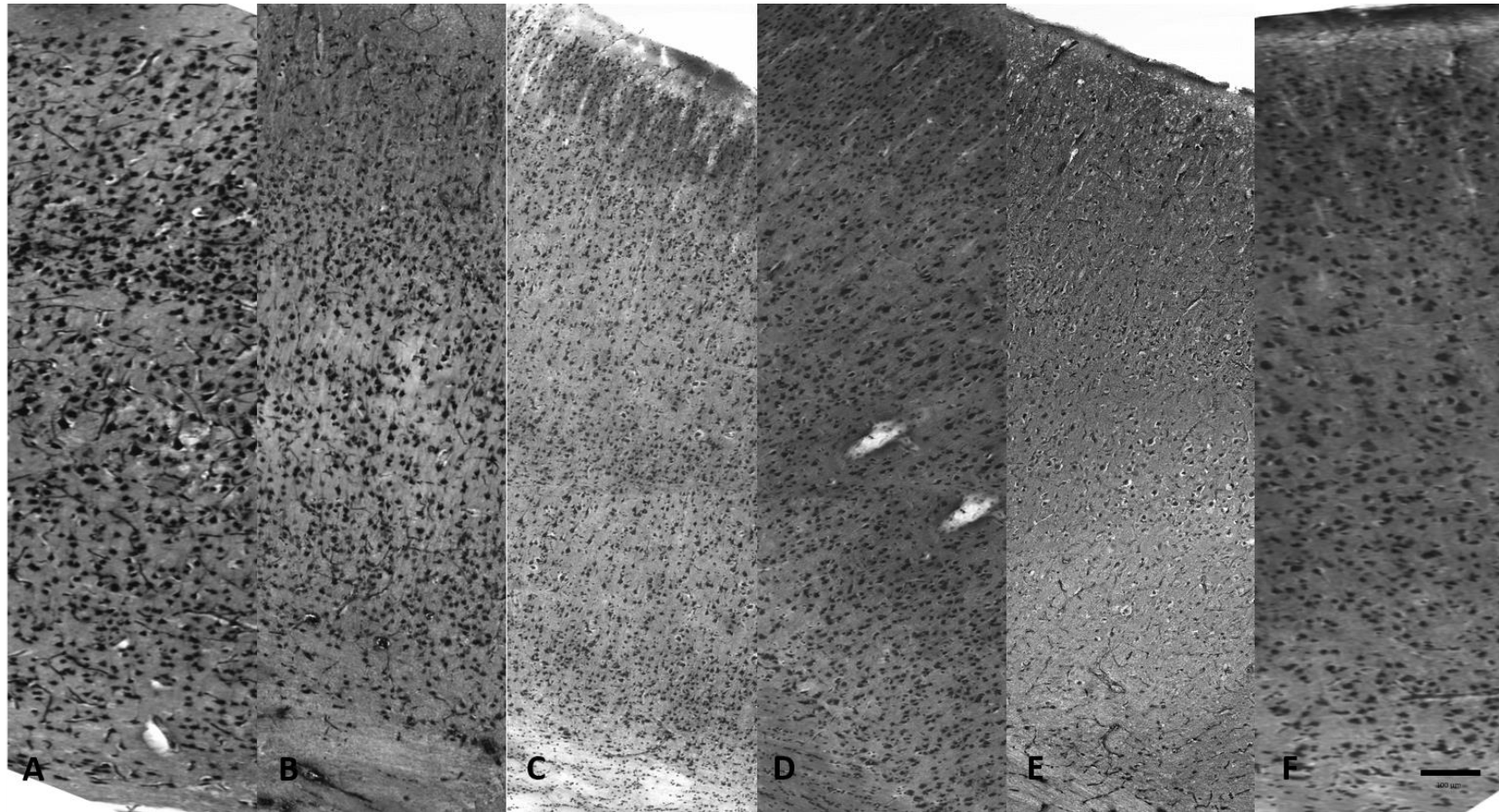


**Figura 11.** Organización laminar de la corteza motora; NeuN-IR – 72 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. Se observa una marcación intensa, abundante cantidad de células positivas y la clara distinción de los límites laminares. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. Se observa mucha semejanza con el control en la cantidad de células y en la calidad de IR, sin embargo, se puede apreciar una reducción en la cantidad de células positivas. A partir de este tiempo se muestra claramente la pérdida celular que se va presentando a lo largo de los diferentes tiempos de cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu\text{m}$ .

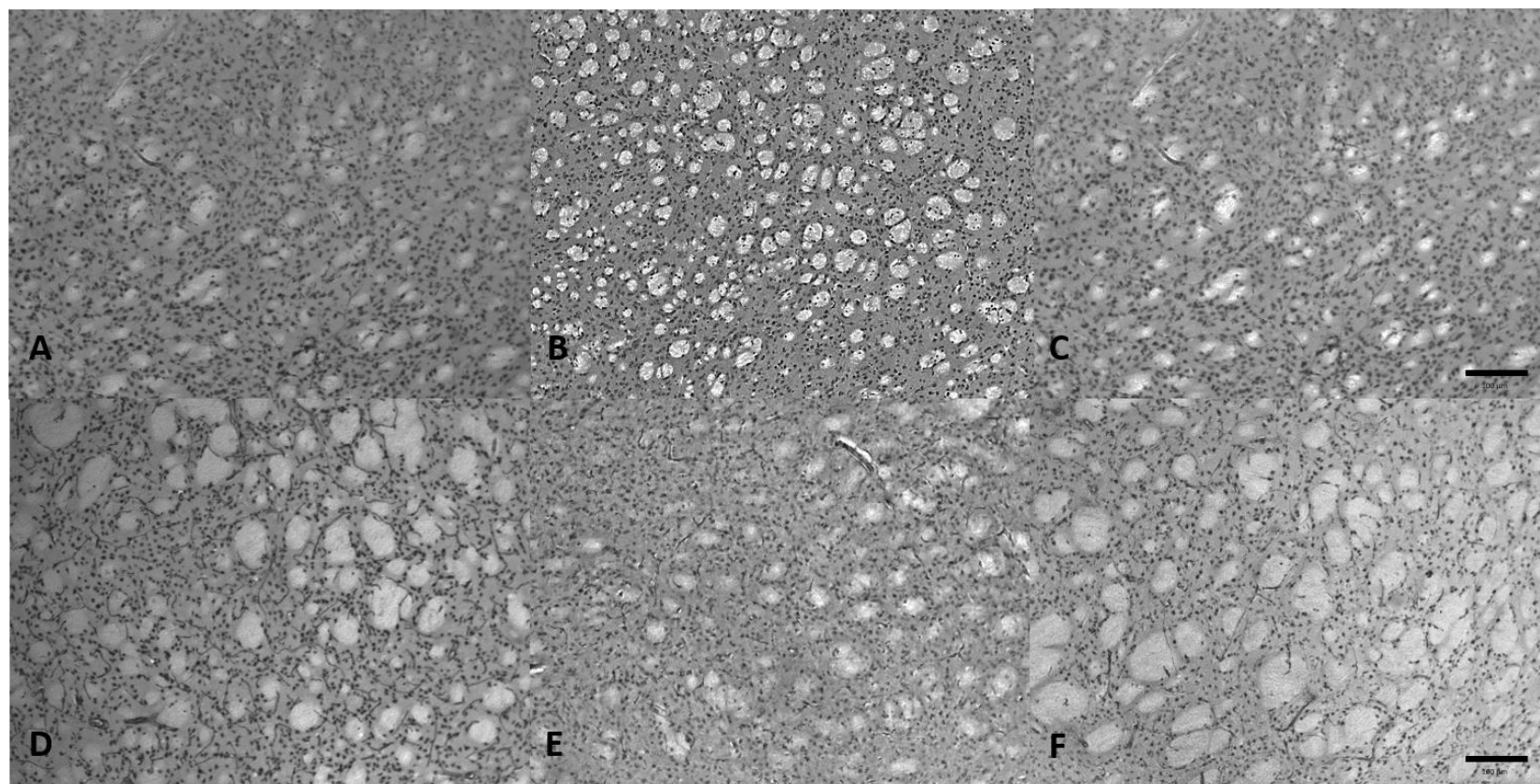


**Figura 12.** Organización laminar de la Corteza Sensorial; NeuN-IR – 48 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. Se observa una marcación intensa, abundante cantidad de células positivas y la clara distinción de los límites laminares. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. Se observa mucha semejanza con el control en la cantidad de células y en la calidad de IR, sin embargo, se puede apreciar una reducción en la cantidad de células positivas. A partir de este tiempo se muestra claramente la pérdida celular que se va presentando a lo largo de los diferentes tiempos de cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.

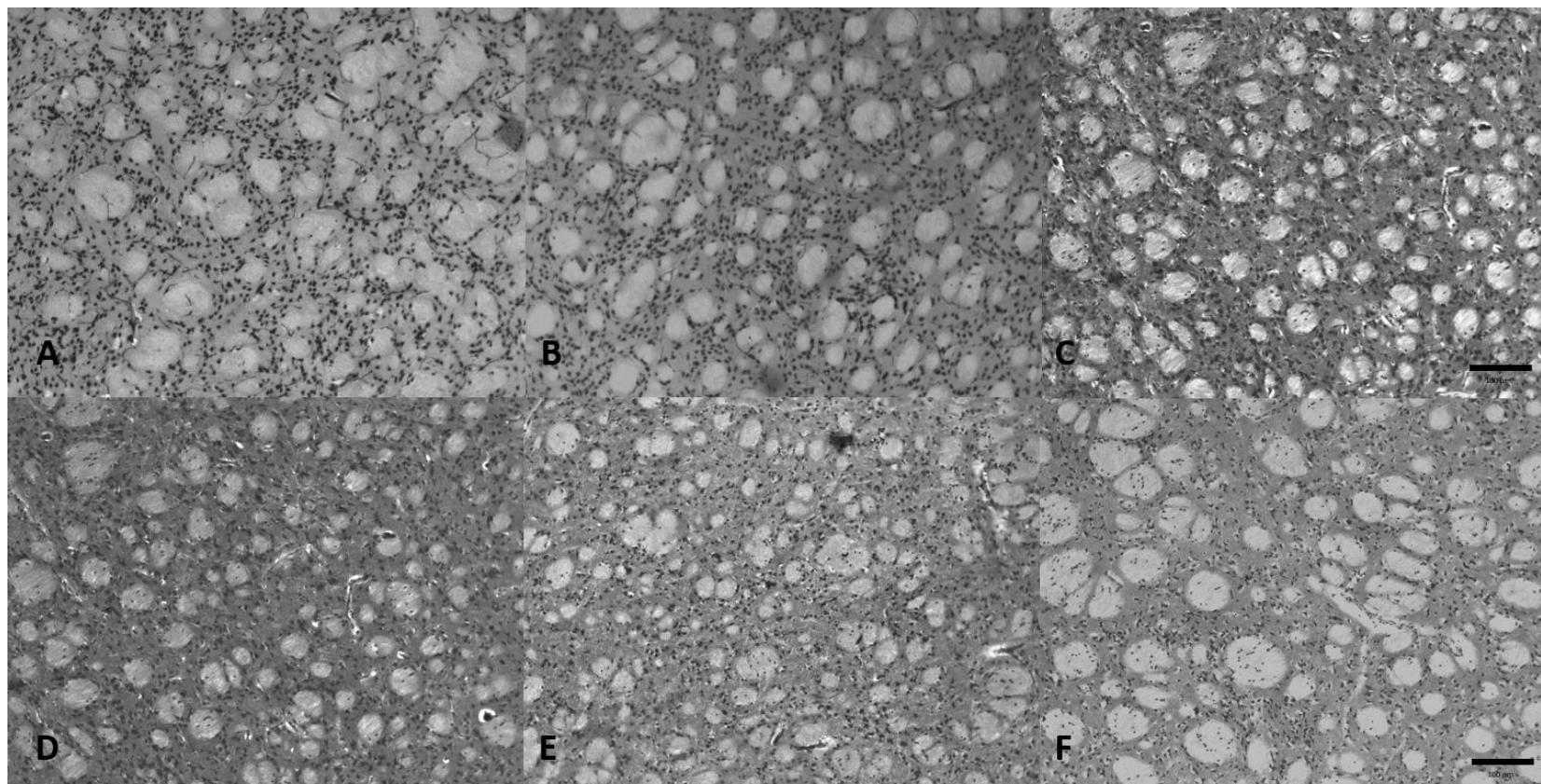




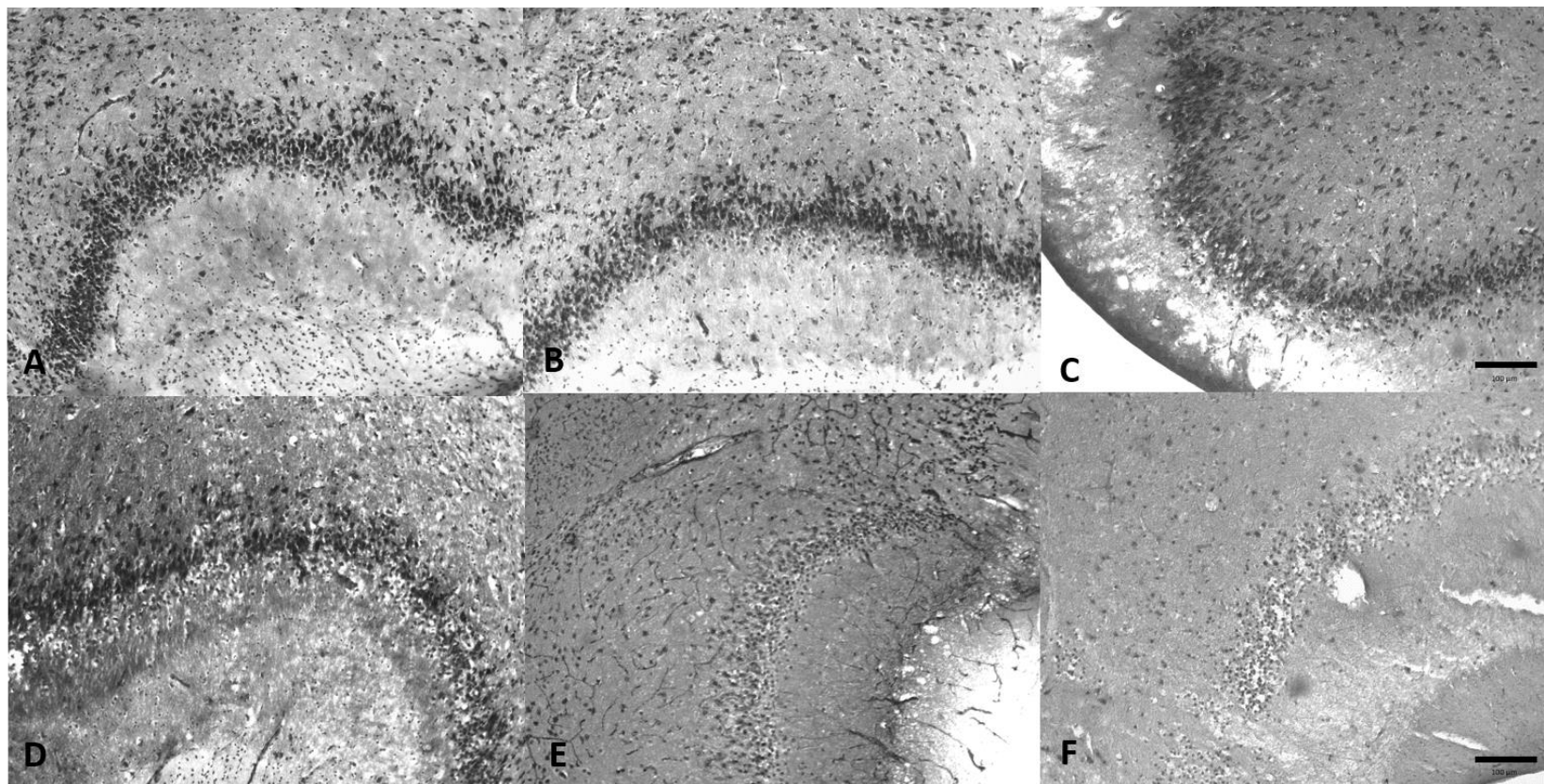
**Figura 13.** Organización laminar de la Corteza Sensorial; NeuN-IR – 72 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. Se observa una marcación intensa, abundante cantidad de células positivas y la clara distinción de los límites laminares. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. Se observa mucha semejanza con el control en la cantidad de células y en la calidad de IR, sin embargo, se puede apreciar una reducción en la cantidad de células positivas. A partir de este tiempo se muestra claramente la pérdida celular que se va presentando a lo largo de los diferentes tiempos de cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.



**Figura 14.** Densidad neuronal en Estriado. NeuN-IR – 48 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.

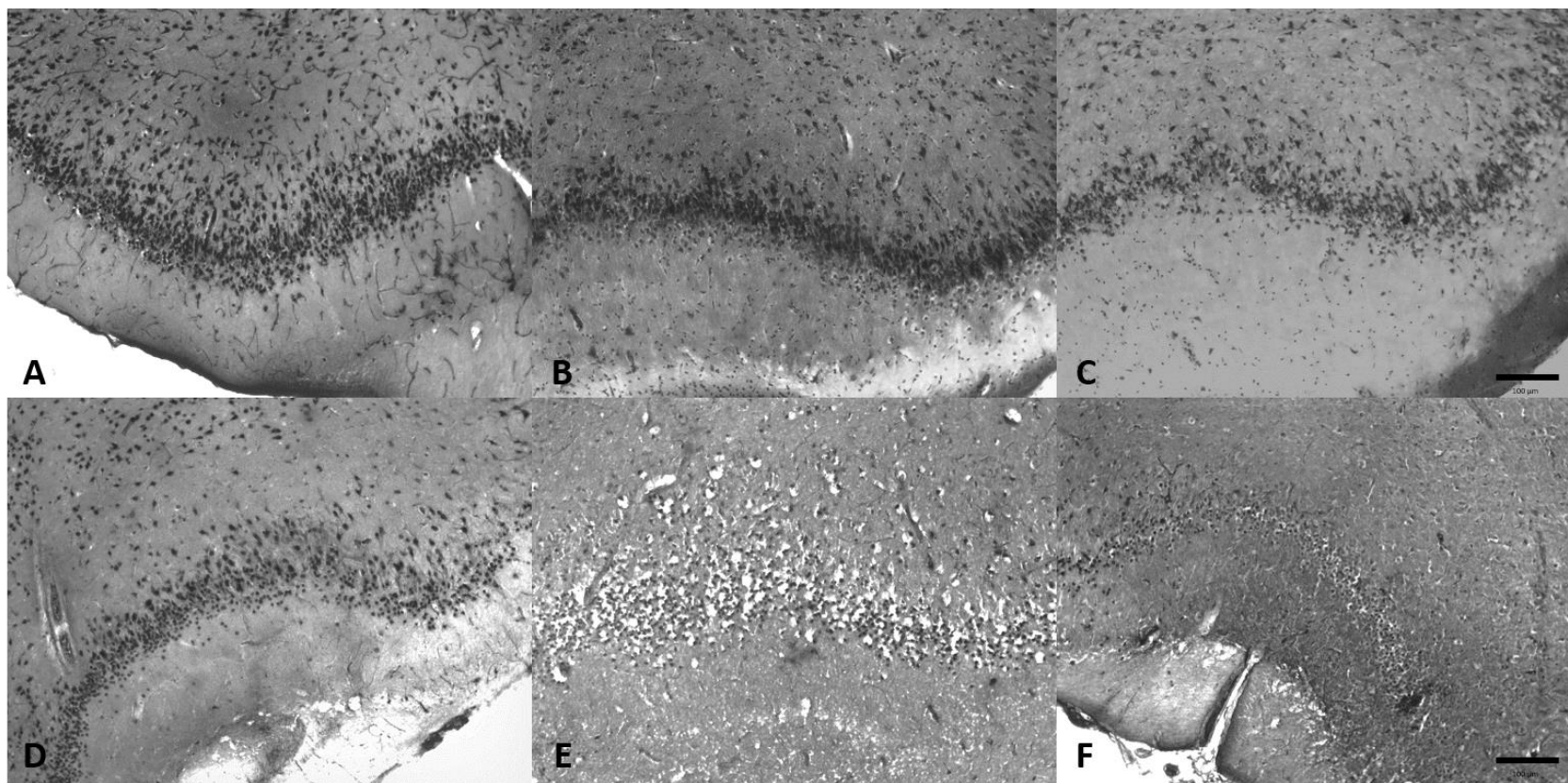


**Figura 15.** Densidad neuronal en Estriado. NeuN-IR – 72 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.

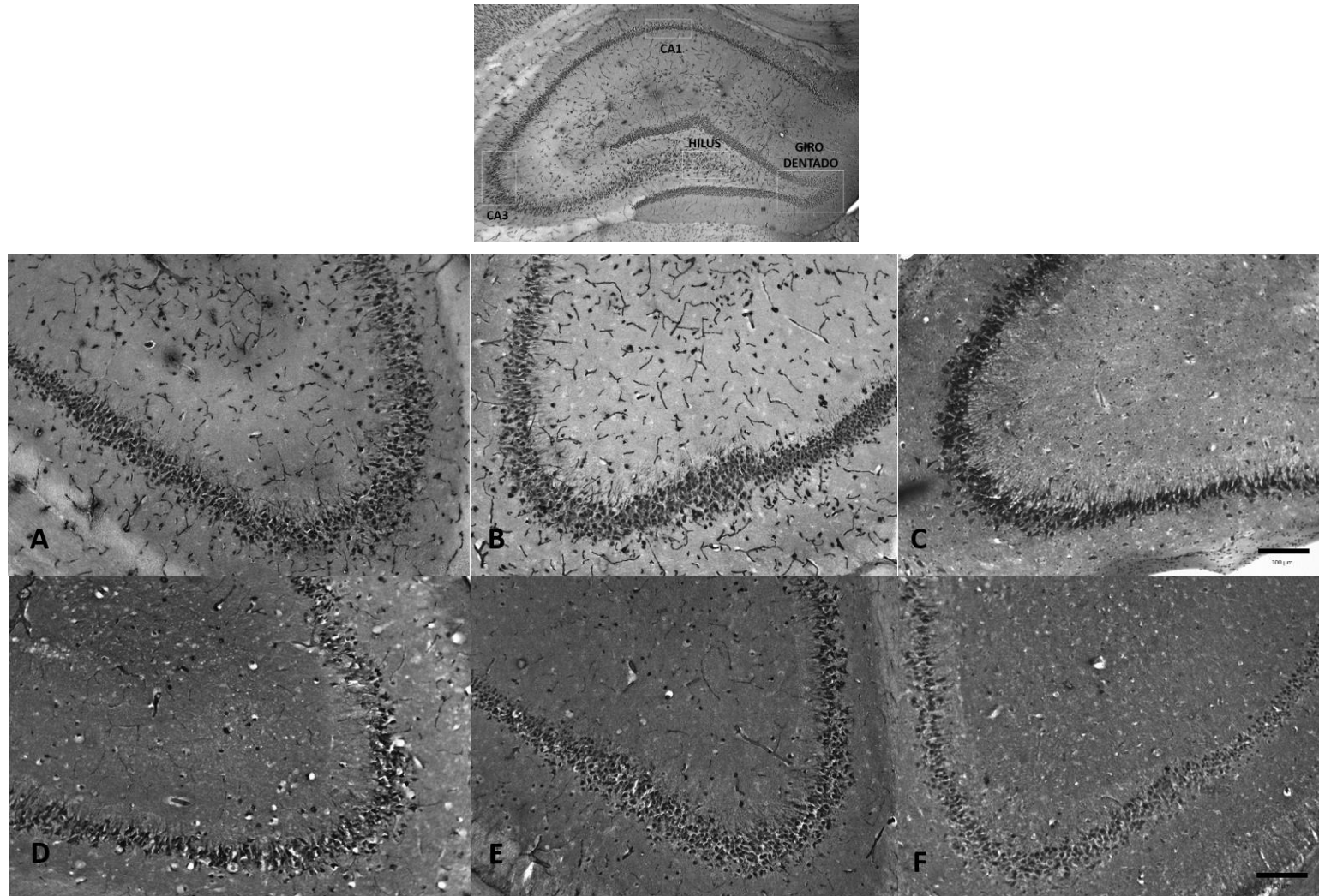


**Figura 16.** Densidad neuronal en Corteza Olfatoria. NeuN-IR – 48 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.

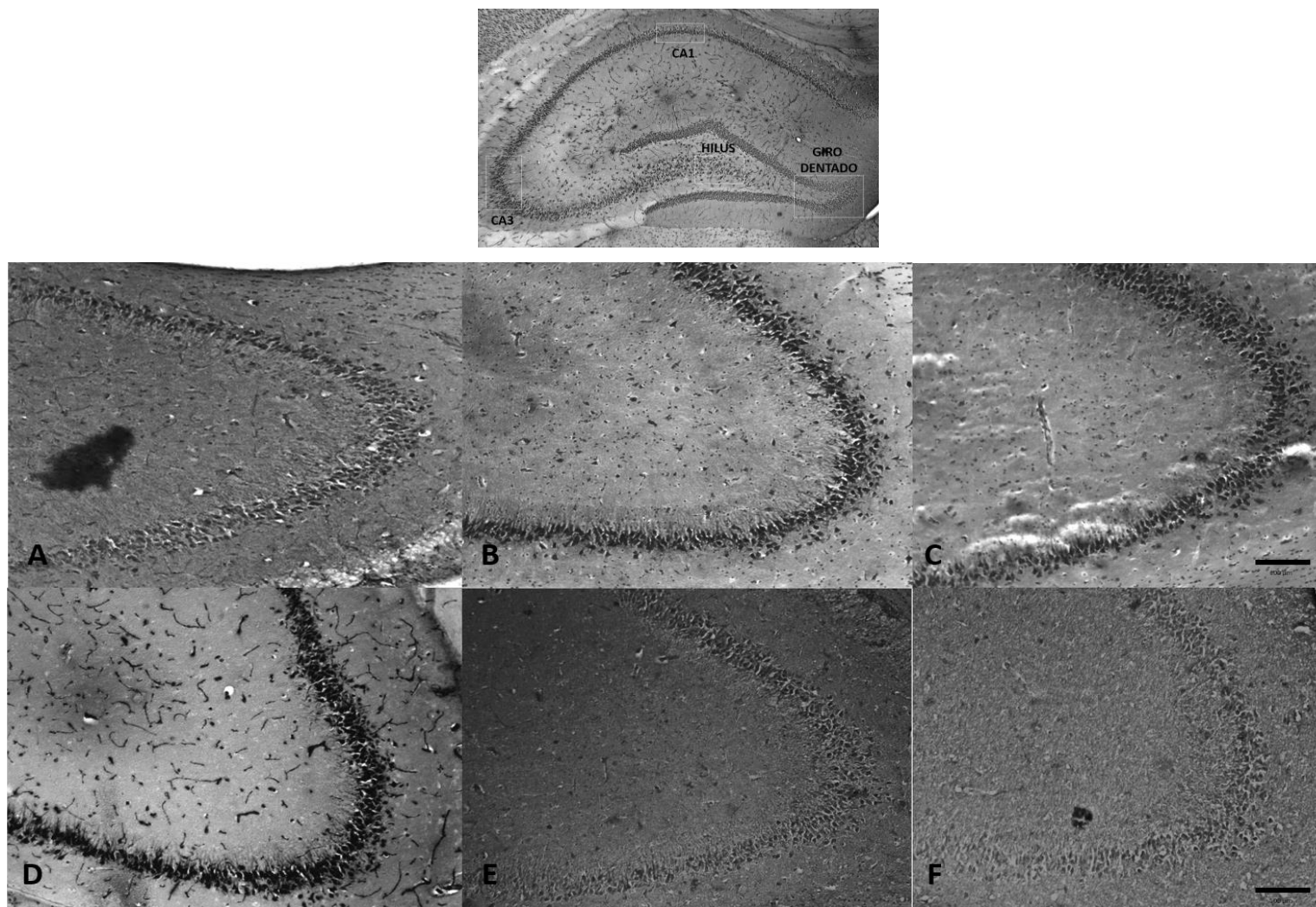




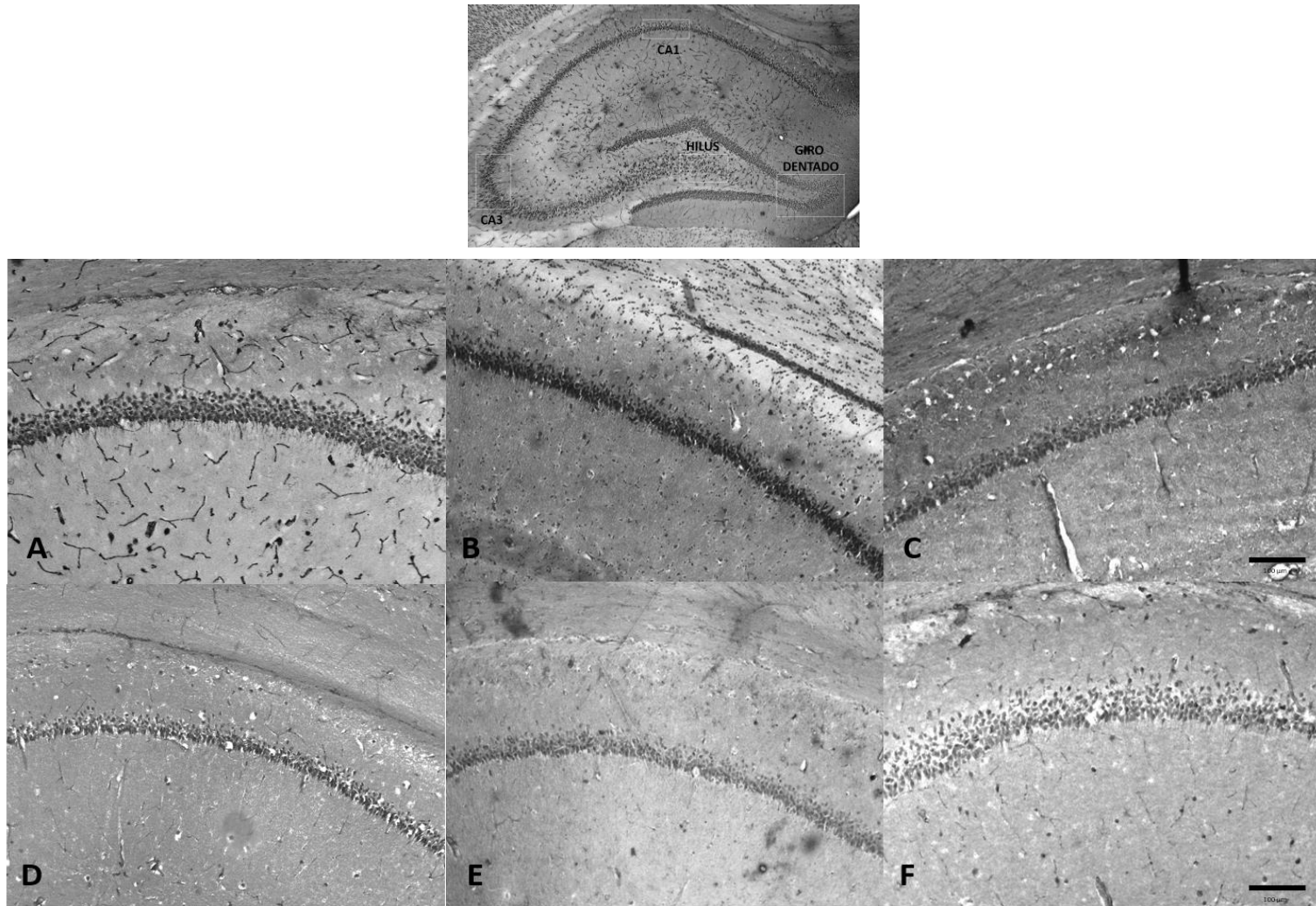
**Figura 17.** Densidad neuronal en Corteza Olfatoria. NeuN-IR – 72 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.



**Figura 18.** Densidad neuronal en Hipocampo – CA3. NeuN-IR – 48 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu\text{m}$ .

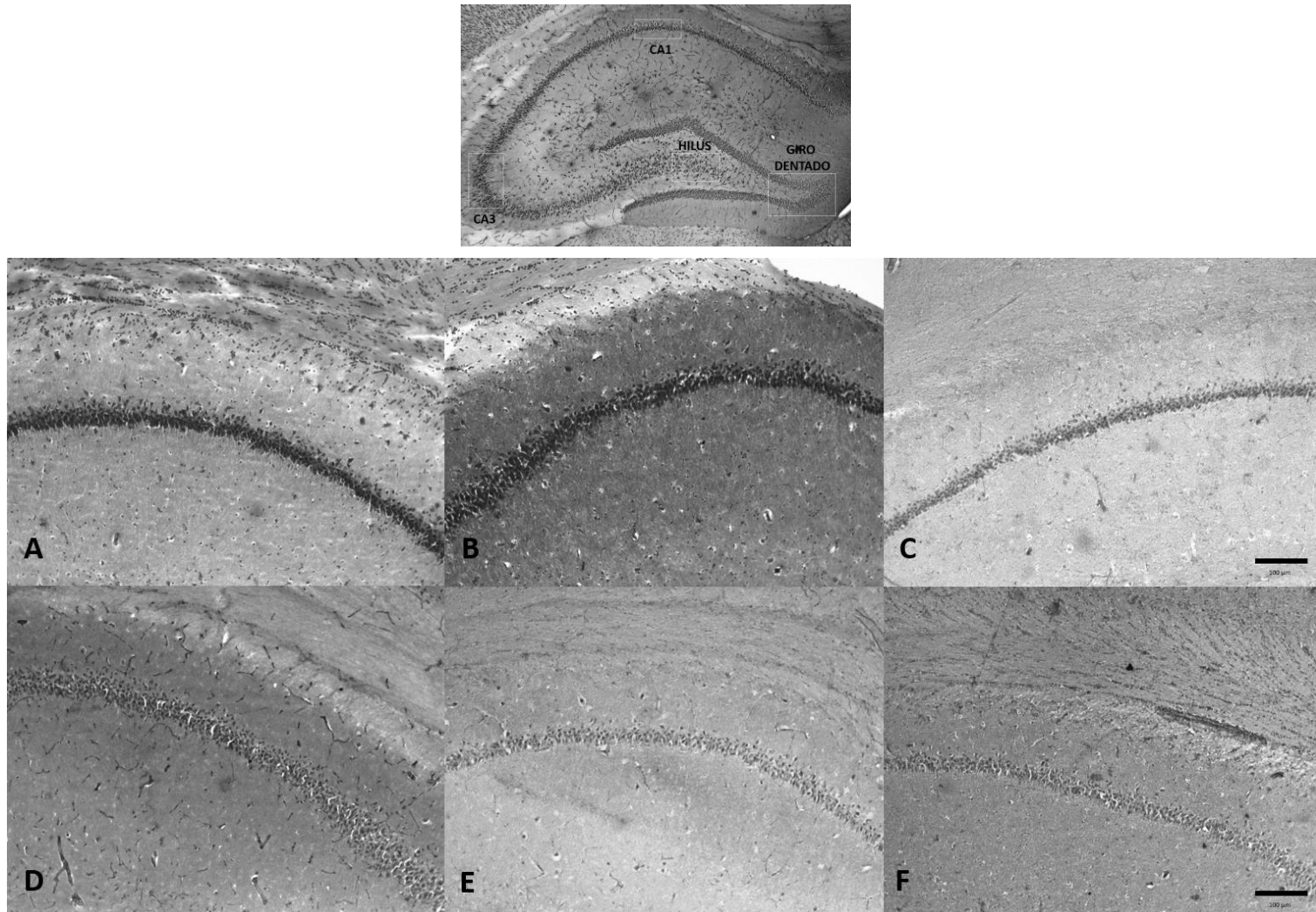


**Figura 19.** Densidad neuronal en Hipocampo – CA3. NeuN-IR – 72 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.

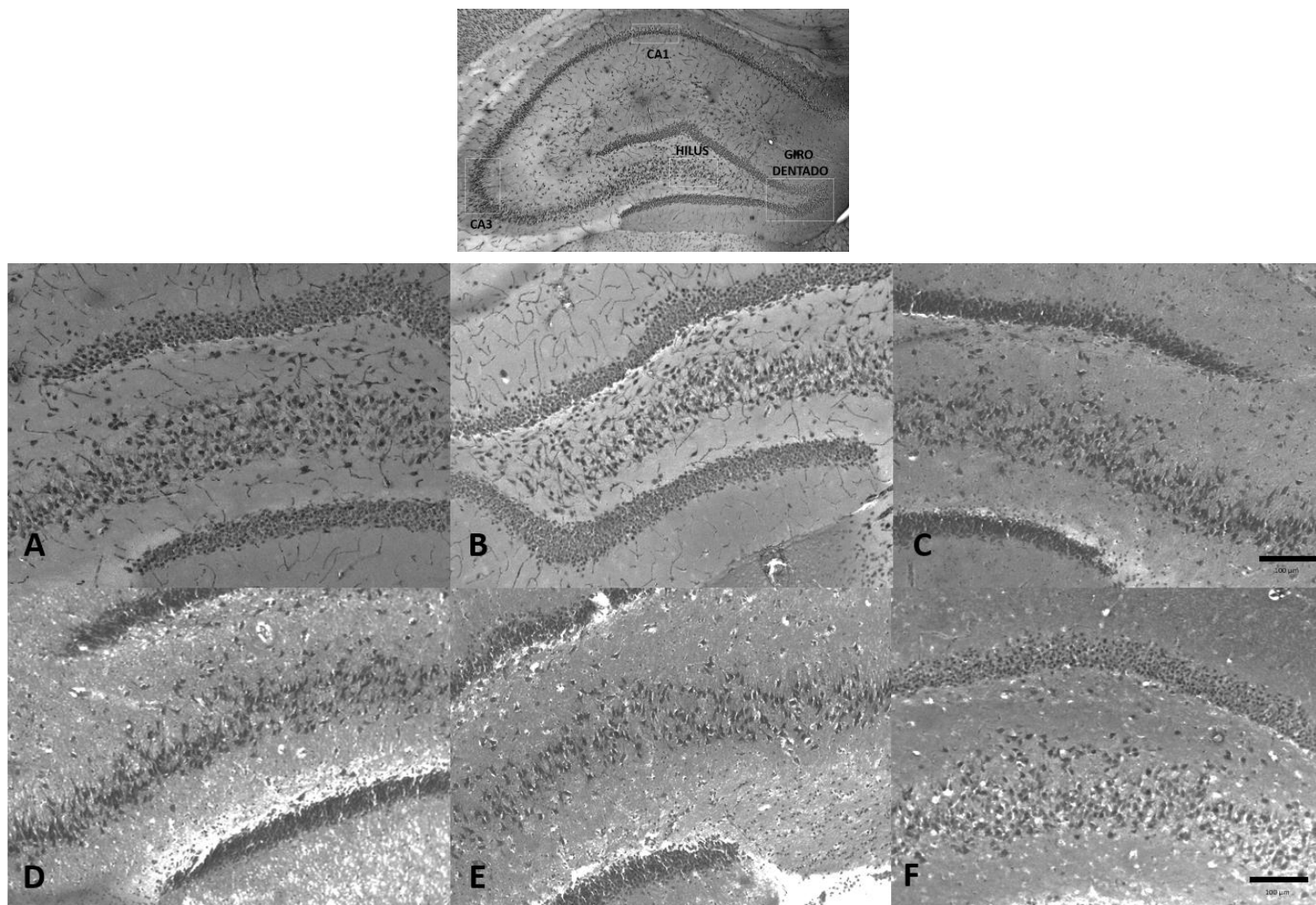


**Figura 20.** Densidad neuronal en Hipocampo – CA1. NeuN-IR – 48 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu\text{m}$ .

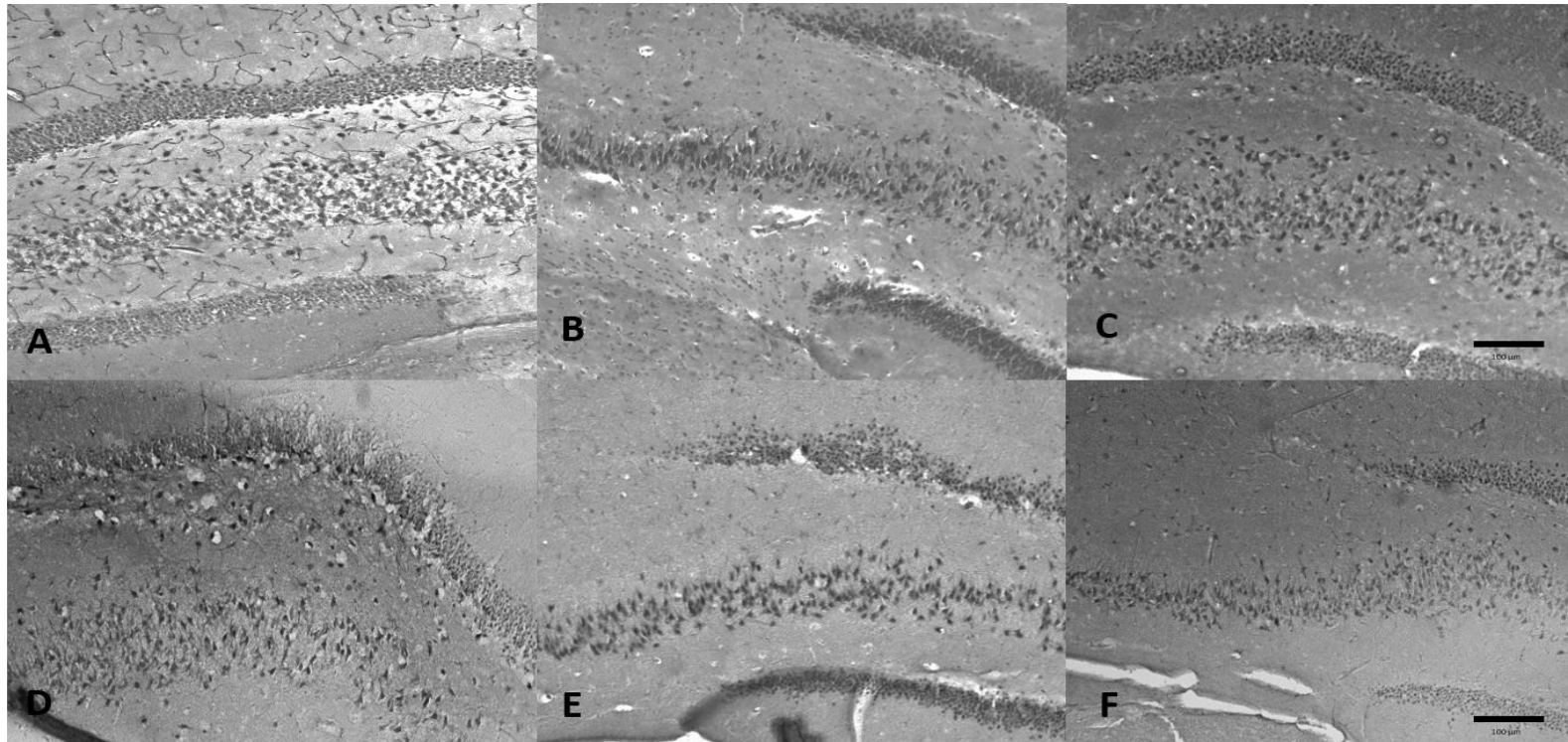
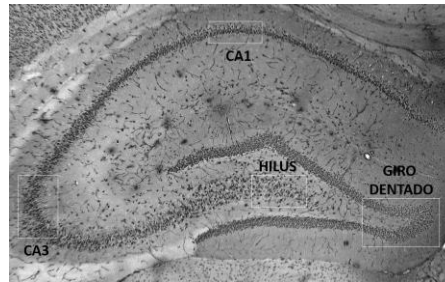




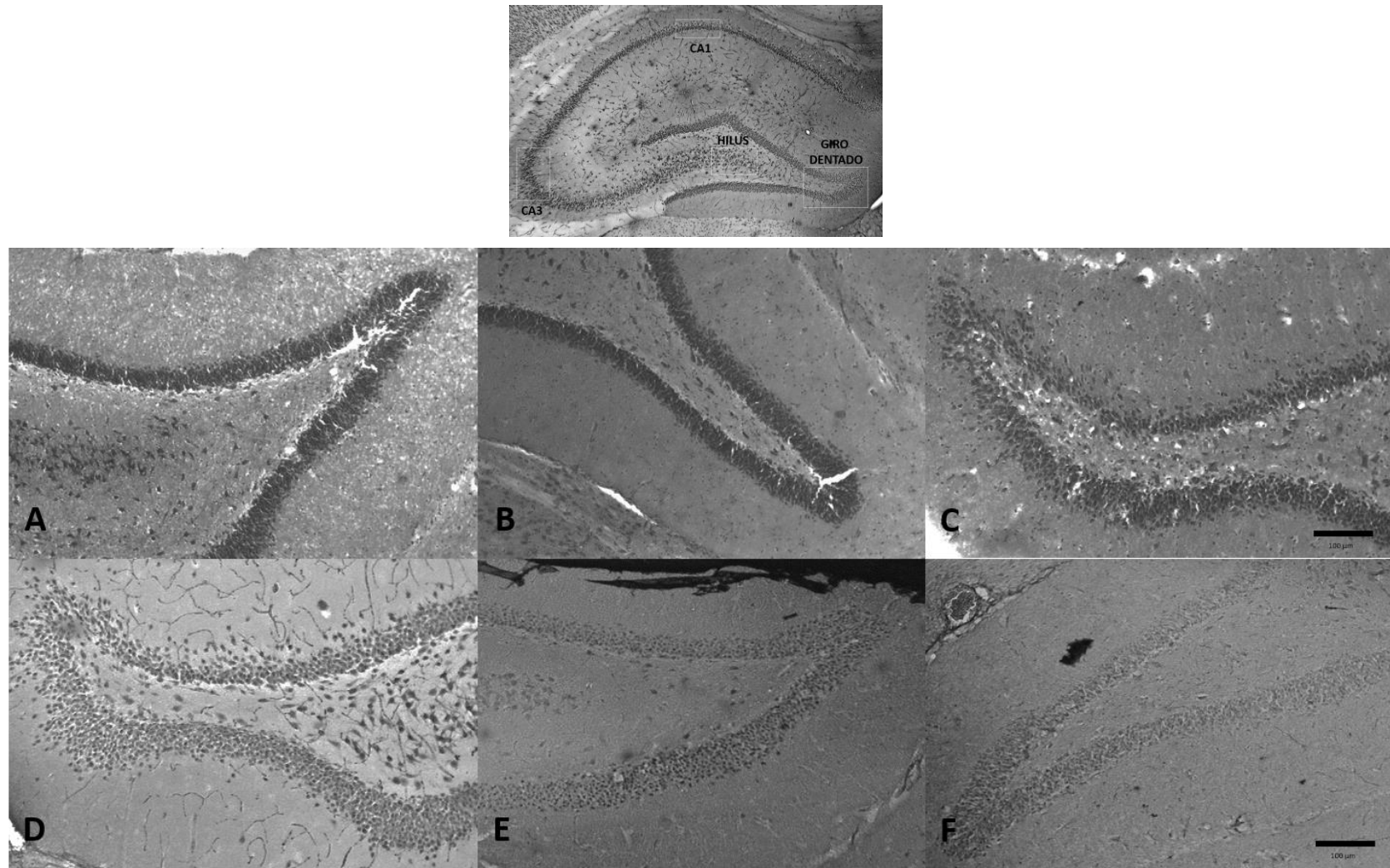
**Figura 21.** Densidad neuronal en Hipocampo – CA1. NeuN-IR – 72 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100 μm.



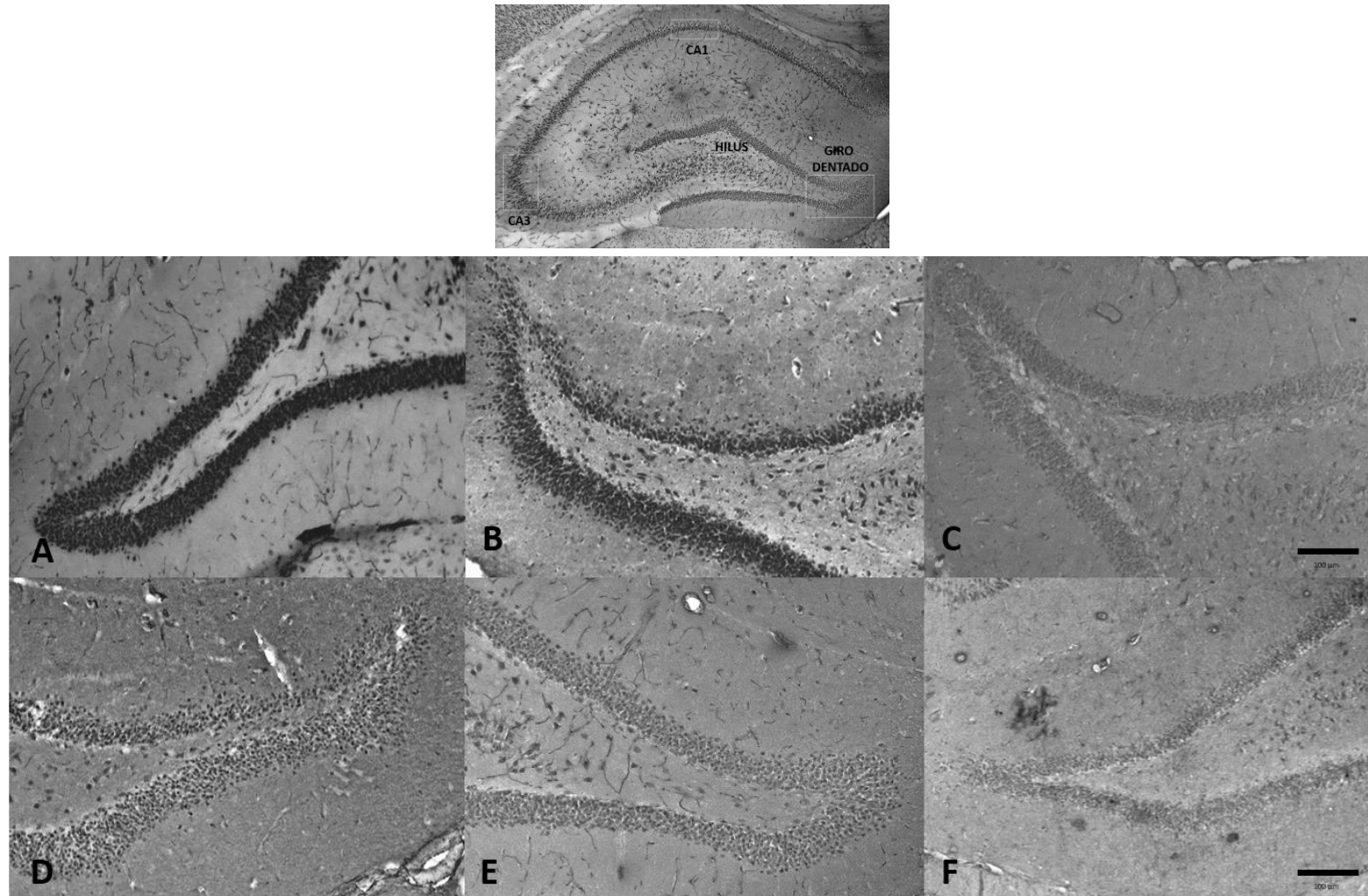
**Figura 22.** Densidad neuronal en Hipocampo – HILUS. NeuN-IR – 48 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.



**Figura 23.** Densidad neuronal en Hipocampo – HILUS. NeuN-IR – 72 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.



**Figura 24.** Densidad neuronal en Hipocampo – Giro Dentado. NeuN-IR – 48 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.



**Figura 25.** Densidad neuronal en Hipocampo – Giro Dentado. NeuN-IR – 72 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100 μm.



### 5.3.2 Datos cuantitativos de la expresión de NeuN

El tiempo de cultivo presenta una relación inversamente proporcional con la expresión de NeuN, tendencia que se mantiene para todas las regiones neuronales estudiadas tanto en el hipocampo como en la corteza somato sensorial; a su vez, se evidencia una menor expresión en los grupos lesionados versus los grupos control. A continuación se enunciarán los aspectos más relevantes de cada región estudiada:

- **CA3**

El análisis bivariado (Inmunoreactividad Vs. Tiempo de cultivo) describe una relación inversamente proporcional entre estas dos variables, es decir, que a mayor tiempo de cultivo se encontró una menor Inmunoreactividad de la proteína NeuN. (Figura 26) La relación descrita fue igual en los cuatro grupos experimentales (A, B, C y D).

Si bien la tendencia fue similar para los cuatro grupos experimentales, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la Inmunoreactividad de NeuN entre el grupo A Vs. grupo B ( $p < 0.0001$ ) y entre el grupo C Vs. grupo D ( $p < 0.0001$ ), siendo mayor en los grupos que no fueron sometidos a trauma (Grupos B y D) (Figura 27).

Al realizar el ANOVA a dos vías (Tiempo de Cultivo VS. Trauma), se encontró que la variable tiempo de cultivo explicaba en mayor medida los cambios en la Inmunoreactividad de la proteína NeuN, siendo el porcentaje de variabilidad de la varianza total explicada por el tiempo de cultivo de un 91.11% y el porcentaje de variabilidad explicado por el trauma fue del 5.77% (Tabla 1).

**Tabla 1.** ANOVA a dos vías. CA3 – NeuN

Two-way RM ANOVA CA3 - NeuN (Alpha = 0.05)							
Source of Variation	% of total variation	P value	Significant?	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
Interaction	1.659	P < 0.0001	Yes	177.8	12	14.81	F (12, 48) = 4.910
Time	91.11	P < 0.0001	Yes	9762	4	2440	F (4, 48) = 808.8
Column Factor	5.777	P < 0.0001	Yes	619	3	206.3	F (3, 12) = 229.6
Subjects (matching)	0.1007	P = 0.9868	No	10.78	12	0.8987	F (12, 48) = 0.2979
Residual				144.8	48	3.017	

Al realizar el análisis multivariado para los diferentes tiempos de cultivo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B a las 0, 2 4 y 6 horas, valor  $p=0.011$ ,  $p=0.001$ ,  $p=0.046$  y  $p=0.018$  respectivamente, lo cual quiere decir que los sujetos que fueron lesionados (grupo A) presentaron una menor expresión de la proteína NeuN comparado con los controles (grupo B); a las 8 horas de cultivo no se encontraron diferencias significativas entre estos dos grupos con un  $p=0.717$ . Entre los grupos C y D se encontró una diferencia estadísticamente significativa a las 0 horas de cultivo ( $p=0.023$ ) donde los sujetos que fueron lesionados (grupo C) presentaron una menor expresión de la proteína NeuN comparado con los controles (grupo D); pero no se encontraron diferencias a las 2, 4, 6 y 8 horas, valor  $p=0.258$ ,  $p=0.230$ ,  $p=0.088$  y  $p=0.743$  respectivamente (Anexo 5 y 6)

- **CA1**

Al igual que en CA3, se encontró que a mayor tiempo de cultivo hubo una menor Inmunoreactividad de la proteína NeuN. La relación descrita fue igual en los cuatro grupos experimentales (A, B, C y D). (Figura 26)

Si bien la tendencia fue similar para los cuatro grupos experimentales, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la Inmunoreactividad de NeuN entre el grupo A Vs. el grupo B ( $p<0.0001$ ) y entre el grupo C Vs. el grupo D ( $p<0.0001$ ), siendo mayor en los grupos que no fueron sometidos a trauma (Grupos B y D) (Figura 27).



Al realizar el ANOVA a dos vías, se encontró que la variable tiempo explicaba en mayor medida los cambios en la Inmunoreactividad de la proteína NeuN siendo el porcentaje de variabilidad de la varianza total explicada por el tiempo de cultivo de un 78.88% y el porcentaje de variabilidad explicado por el trauma fue del 15.24% (Tabla 2).

**Tabla 2.** ANOVA a dos vías. CA1 – NeuN

<b>Two-way RM ANOVA CA1 - NeuN (Alpha = 0.05)</b>							
<b>Source of Variation</b>	<b>% of total variation</b>	<b>P value</b>	<b>Significant?</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>
<i>Interaction</i>	4.115	P < 0.0001	Yes	566.7	12	47.22	F (12, 48) = 10.89
<i>Time</i>	78.88	P < 0.0001	Yes	10863	4	2716	F (4, 48) = 626.4
<i>Column Factor</i>	15.24	P < 0.0001	Yes	2099	3	699.7	F (3, 12) = 243.4
<i>Subjects (matching)</i>	0.2504	P = 0.7772	No	34.49	12	2.874	F (12, 48) = 0.6629
<i>Residual</i>				208.1	48	4.336	

Al realizar el análisis multivariado para los diferentes tiempos de cultivo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B a las 2, 4 y 6 horas, valor  $p=0.010$ ,  $p=0.000$ ,  $p=0.010$  respectivamente, lo cual quiere decir que los sujetos que fueron lesionados (grupo A) presentaron una menor expresión de la proteína NeuN comparado con los controles (grupo B); pero no se encontraron diferencias significativas a las 0 y 8 horas de cultivo, valor  $p=0.491$  y  $p=0.717$  respectivamente. Entre los grupos C y D se encontraron diferencias significativas a las 4, 6 y 8 horas de cultivo,  $p=0.002$ ,  $p=0.002$ ,  $p=0.002$  respectivamente, donde los sujetos que fueron lesionados (grupo C) presentaron una menor expresión de la proteína NeuN comparado con los controles (grupo D); pero no se encontraron diferencias a las A las 0 y 2 horas de cultivo, valor  $p=0.134$  y  $p=0.263$  respectivamente (Anexo 5 y 6)

- **Hilus**

También se encontró que a mayor tiempo de cultivo hubo una menor Inmunoreactividad de la proteína NeuN. La relación descrita fue igual en los cuatro grupos experimentales (A, B, C y D). (Figura 26)

Si bien la tendencia fue similar para los cuatro grupos experimentales, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la Inmunoreactividad de NeuN entre el grupo A Vs. el grupo B ( $p < 0.0001$ ) y entre el grupo C Vs. el grupo D ( $p < 0.0001$ ), siendo mayor en los grupos que no fueron sometidos a trauma (Grupos B y D) (Figura 27).

Al realizar el ANOVA a dos vías, se encontró que la variable tiempo explicaba en mayor medida los cambios en la Inmunoreactividad de la proteína NeuN siendo el porcentaje de variabilidad de la varianza total explicada por el tiempo de cultivo de un 75.62% y el porcentaje de variabilidad explicado por el trauma fue del 13.28%. (Tabla 3)

**Tabla 3.** ANOVA a dos vías. Hilus – NeuN

Two-way RM ANOVA Hilus - NeuN (Alpha = 0.05)							
Source of Variation	% of total variation	P value	Significant?	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
<i>Interaction</i>	4.115	5.669	Yes	44	12	3.64	F (12, 48) = 4.894
<i>Time</i>	78.88	75.62	Yes	582	4	146	F (4, 48) = 195.8
<i>Column Factor</i>	15.24	13.28	Yes	102	3	34.1	F (3, 12) = 66.64
<i>Subjects (matching)</i>	0.2504	0.7972	No	6.1	12	0.51	F (12, 48) = 0.6882
<i>Residual</i>				36	48	0.74	

Al realizar el análisis multivariado para los diferentes tiempos de cultivo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos de cultivo 0, 2, 4, 6 y 8 horas;  $p=0.395$ ,  $p=0.258$ ,  $p=0.100$ ,  $p=0.054$  y  $p=0.150$  respectivamente. Entre los grupos C y D tampoco se encontraron diferencias significativas en

ninguno de los tiempos de cultivo 0, 2, 4, 6 y 8 horas;  $p=0.116$ ,  $p=0.389$ ,  $p=0.072$ ,  $p=0.199$  y  $p=0.703$  respectivamente (Anexo 5 y 6)

- **Giro Dentado**

También se encontró que a mayor tiempo de cultivo hubo una menor Inmunoreactividad de la proteína NeuN. La relación descrita fue igual en los cuatro grupos experimentales (A, B, C y D). (Figura 26)

Si bien la tendencia fue similar para los cuatro grupos experimentales, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la Inmunoreactividad de NeuN entre el grupo A Vs. el grupo B ( $p<0.0001$ ) y entre el grupo C Vs. el grupo D ( $p<0.0001$ ), siendo mayor en los grupos que no fueron sometidos a trauma (Grupos B y D) (Figura 27).

Al realizar el ANOVA a dos vías, se encontró que la variable tiempo explicaba en mayor medida los cambios en la Inmunoreactividad de la proteína NeuN siendo el porcentaje de variabilidad de la varianza total explicada por el tiempo de cultivo de un 80.66% y el porcentaje de variabilidad explicado por el trauma fue del 9.16% (Tabla 4).

**Tabla 4.** ANOVA a dos vías. Giro Dentado - NeuN

Two-way RM ANOVA Giro Dentado - NeuN (Alpha = 0.05)							
Source of Variation	% of total variation	P value	Significant?	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
Interaction	5.006	$P < 0.0001$	Yes	126.8	12	10.56	$F (12, 48) = 5.505$
Time	80.66	$P < 0.0001$	Yes	2042	4	510.6	$F (4, 48) = 266.1$
Column Factor	9.165	$P < 0.0001$	Yes	232.1	3	77.36	$F (3, 12) = 23.90$
Subjects (matching)	1.534	$P = 0.0998$	No	38.84	12	3.237	$F (12, 48) = 1.687$
Residual				92.12	48	1.919	

Al realizar el análisis multivariado para los diferentes tiempos de cultivo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos de cultivo 0, 2,

4, 6 y 8 horas;  $p=0.497$ ,  $p=0.071$ ,  $p=0.562$ ,  $p=0.532$  y  $p=0.243$  respectivamente. Entre los grupos C y D tampoco se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos de cultivo 0, 2, 4, 6 y 8 horas;  $p=0.116$ ,  $p=0.389$ ,  $p=0.072$ ,  $p=0.199$  y  $p=0.703$  respectivamente (Anexo 5 y 6)

- **Corteza Motora**

Para la Corteza Motora, también se encontró que a mayor tiempo de cultivo hubo una menor Inmunoreactividad de la proteína NeuN. La relación descrita fue igual en los cuatro grupos experimentales (A, B, C y D). (Figura 26)

No se encontraron diferencias significativas para la Inmunoreactividad de NeuN entre los cuatro grupos experimentales, es decir no se encontró diferencia estadística significativa entre el grupo A Vs. el grupo B ( $p>0.0001$ ) y entre el grupo C Vs. el grupo D ( $p>0.0001$ ). (Figura 27).

Al realizar el ANOVA a dos vías, se encontró que la variable tiempo de cultivo explicaba en mayor medida los cambios en la Inmunoreactividad de la proteína NeuN, siendo el porcentaje de variabilidad de la varianza total explicada por el tiempo de cultivo de un 70.38% y el porcentaje de variabilidad explicado por el trauma fue del 6.27% (Tabla 5).

**Tabla 5.** ANOVA a dos vías. Corteza Motora – NeuN

Two-way RM ANOVA Corteza Motora - NeuN (Alpha = 0.05)							
Source of Variation	% of total variation	P value	Significant?	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
<i>Interaction</i>	15.02	$P < 0.0001$	Yes	29187	12	2432	$F (12, 48) = 10.88$
<i>Time</i>	70.38	$P < 0.0001$	Yes	136744	4	34186	$F (4, 48) = 152.9$
<i>Column Factor</i>	6.268	$P = 0.0022$	Yes	12178	3	4059	$F (3, 12) = 8.948$
<i>Subjects (matching)</i>	2.802	$P = 0.0419$	Yes	5444	12	453.6	$F (12, 48) = 2.029$
<i>Residual</i>				10732	48	223.6	

Al realizar el análisis multivariado para los diferentes tiempos de cultivo y haciendo una distinción entre láminas supragranulares e infragranulares, se encontró que:

Para los grupos A y B, en láminas supragranulares, se encontraron diferencias significativas en los tiempos de cultivo 0, 2, 6 y 8 horas,  $p=0.010$ ,  $p=0.003$ ,  $p=0.000$  y  $p=0.000$  respectivamente, lo cual quiere decir que a las 0 y 2 horas de cultivo los sujetos que fueron lesionados presentaron una mayor expresión de la proteína NeuN comparado con los controles y a las 6 y 8 horas los sujetos lesionados presentaron una menor expresión de la proteína. A las 4 horas de cultivo no se encontraron diferencias significativas,  $p=0.167$ . Para los mismos grupos A y B, pero en láminas Infragranulares también se encontraron diferencias significativas en los tiempos de cultivo 0 y 8 horas,  $p=0.000$  y  $p=0.003$  respectivamente lo cual quiere decir que los sujetos que sufrieron lesión presentaron una mayor expresión de la proteína NeuN comparado con los controles. A las 2, 4 y 6 horas de cultivo no se encontraron diferencias significativas  $p=0.462$ ,  $p=0.955$  y  $p=0.836$ .

Para los grupos C y D en láminas supragranulares, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos de cultivo 0, 2, 4, 6 y 8 horas;  $p=0.491$ ,  $p=0.405$ ,  $p=0.712$ ,  $p=0.553$  y  $p=0.165$  respectivamente, siendo la expresión de NeuN similar en ambos grupos. En láminas infragranulares se encontraron diferencias significativas a las 0 y 2 horas de cultivo,  $p=0.029$  y  $p=0.026$  respectivamente. Esto quiere decir que los sujetos que sufrieron lesión (grupo C) presentaron una menor expresión de la proteína NeuN comparado con el grupo D. No se encontraron diferencias significativas en los tiempos de cultivo 4, 6 y 8 horas;  $p=0.973$ ,  $p=0.195$  y  $p=1.000$  respectivamente, siendo la expresión de NeuN similar en ambos grupos. (Anexo 5 y 6)

- **Corteza Sensorial**

Para la Corteza Sensorial, también se encontró que a mayor tiempo de cultivo hubo una menor Inmunoreactividad de la proteína NeuN. La relación descrita fue igual en los cuatro grupos experimentales (A, B, C y D). (Figura 26)

No se encontraron diferencias significativas para la Inmunoreactividad de NeuN entre los cuatro grupos experimentales, es decir no se encontró diferencia estadística significativa entre el grupo A Vs. el grupo B ( $p > 0.0001$ ) y entre el grupo C Vs. el grupo D ( $p > 0.0001$ ). (Figura 27).

Al realizar el ANOVA a dos vías, se encontró que la variable tiempo de cultivo explicaba en mayor medida los cambios en la Inmunoreactividad de la proteína NeuN, siendo el porcentaje de variabilidad de la varianza total explicada por el tiempo de cultivo de un 71.60% y el porcentaje de variabilidad explicado por el trauma fue del 5.26% (Tabla 6).

**Tabla 6.** ANOVA a dos vías. Corteza Sensorial – NeuN

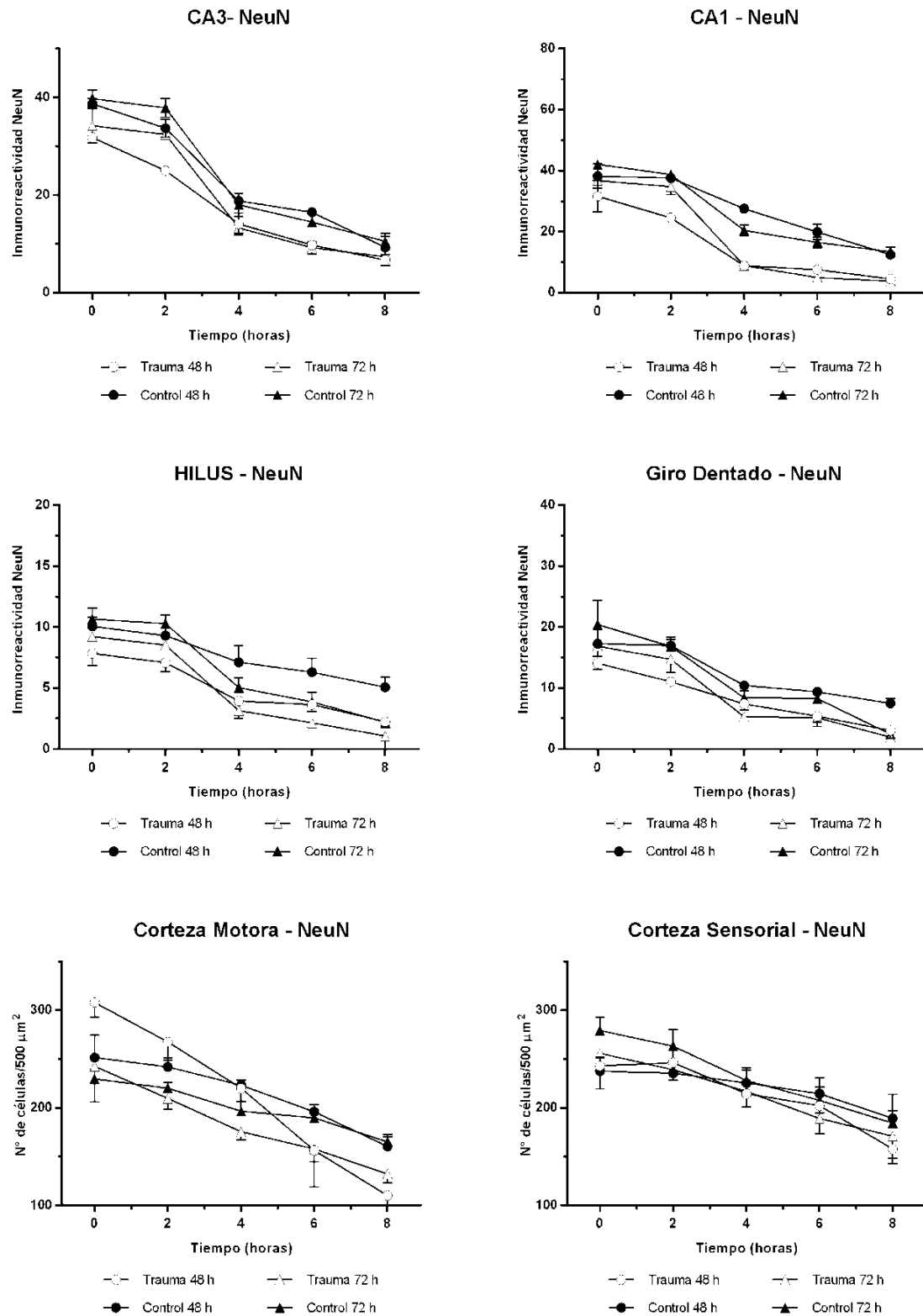
Two-way RM ANOVA Corteza Sensorial - NeuN (Alpha = 0.05)							
Source of Variation	% of total variation	P value	Significant?	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
<i>Interaction</i>	6.017	$P < 0.0001$	Yes	5489	12	457.4	$F (12, 48) = 4.574$
<i>Time</i>	71.6	$P < 0.0001$	Yes	65317	4	16329	$F (4, 48) = 163.3$
<i>Column Factor</i>	5.255	$P = 0.2062$	No	4794	3	1598	$F (3, 12) = 1.771$
<i>Subjects (matching)</i>	11.87	$P < 0.0001$	Yes	10830	12	902.5	$F (12, 48) = 9.026$
<i>Residual</i>				4800	48	100	

Al realizar el análisis multivariado para los diferentes tiempos de cultivo y haciendo una distinción entre láminas supragranulares e infragranulares, se encontró que:

Para los grupos A y B, en láminas supragranulares se encontraron diferencias significativas sólo a las 8 horas de cultivo,  $p = 0.002$ . Esto quiere decir que los sujetos que fueron lesionados (grupo A) presentaron una menor expresión de la proteína NeuN comparado con los controles (grupo B). No se encontraron diferencias significativas en los tiempos de cultivo 0, 2, 4 y 6 horas; ( $p = 0.760$ ), ( $p = 0.697$ ), ( $p = 0.142$ ) y ( $p = 0.072$ ) respectivamente, siendo la expresión de NeuN

similar en ambos grupos. En láminas infragranulares se encontraron diferencias significativas sólo a las 2 horas,  $p=0.008$  lo cual indica que los sujetos lesionados presentaron una mayor expresión de la proteína NeuN comparado con los controles. No se encontraron diferencias significativas en los tiempos de cultivo 0, 4, 6 y 8 horas;  $p=1.000$ ,  $p=0.999$ ,  $p=0.991$  y  $p=0.916$  respectivamente.

Para los grupos C y D, en láminas supragranulares no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos de cultivo 0, 2, 4, 6 y 8 horas;  $p=0.491$ ,  $p=0.405$ ,  $p=0.712$ ,  $p=0.553$  y  $p=0.165$ , respectivamente, siendo la expresión de NeuN similar en ambos grupos. En láminas infragranulares se encontraron diferencias significativas a las 0 y 2 horas de cultivo,  $p=0.029$  y  $p=0.026$  respectivamente. Esto quiere decir que los sujetos lesionados (grupo C) presentaron una menor expresión de la proteína NeuN comparado con los controles (grupo D). No se encontraron diferencias significativas en los tiempos de cultivo 4, 6 y 8 horas;  $p=0.973$ ,  $p=0.195$  y  $p=1.000$  respectivamente. (Anexo 5 y 6)



**Figura 26.** Análisis bivariado: Inmunoreactividad NeuN Vs. Tiempo de cultivo



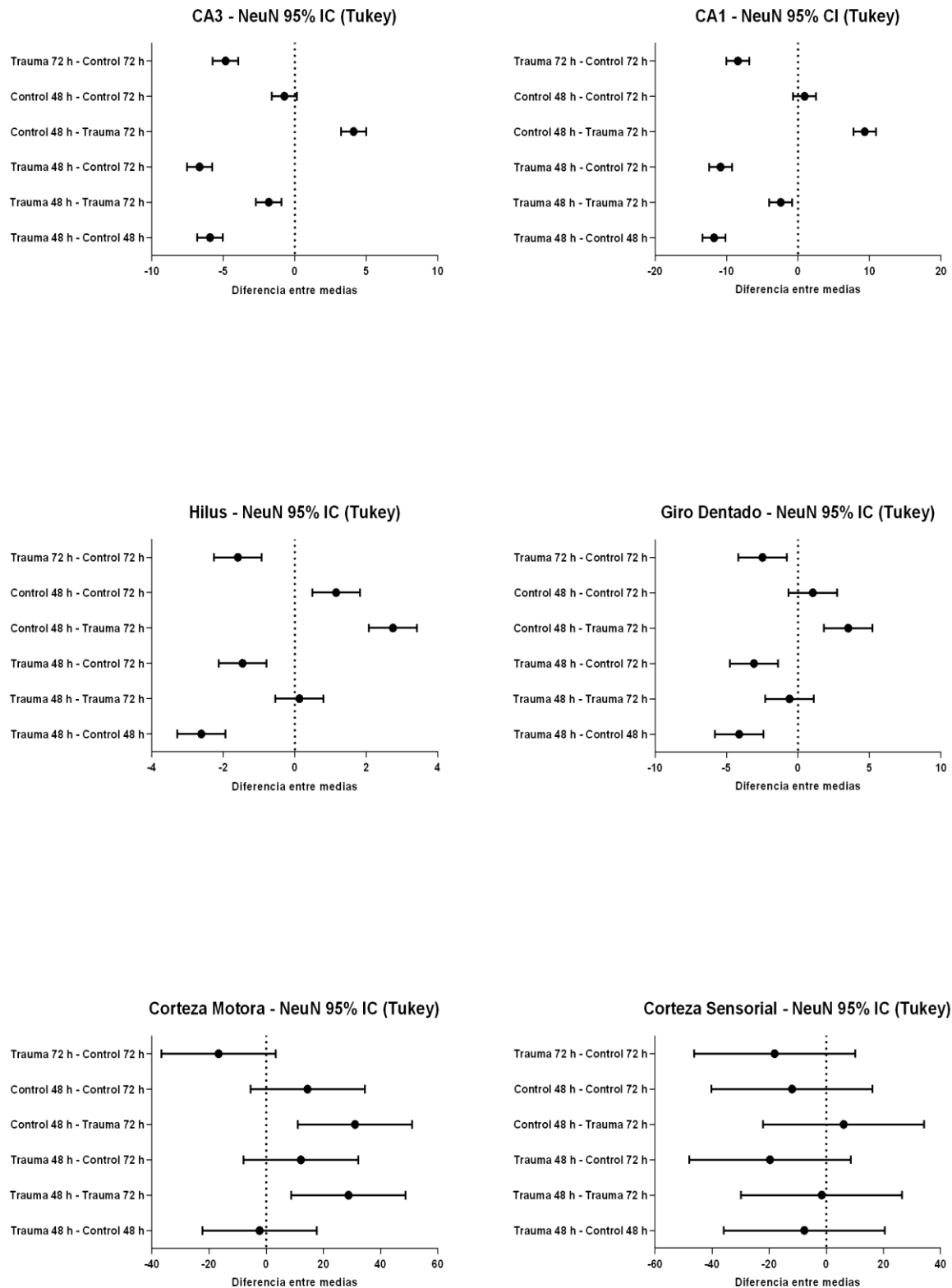


Figura 27. Prueba post hoc de Tukey

## **5.4 Proteína precursora Amiloide (APP), extremo N-terminal**

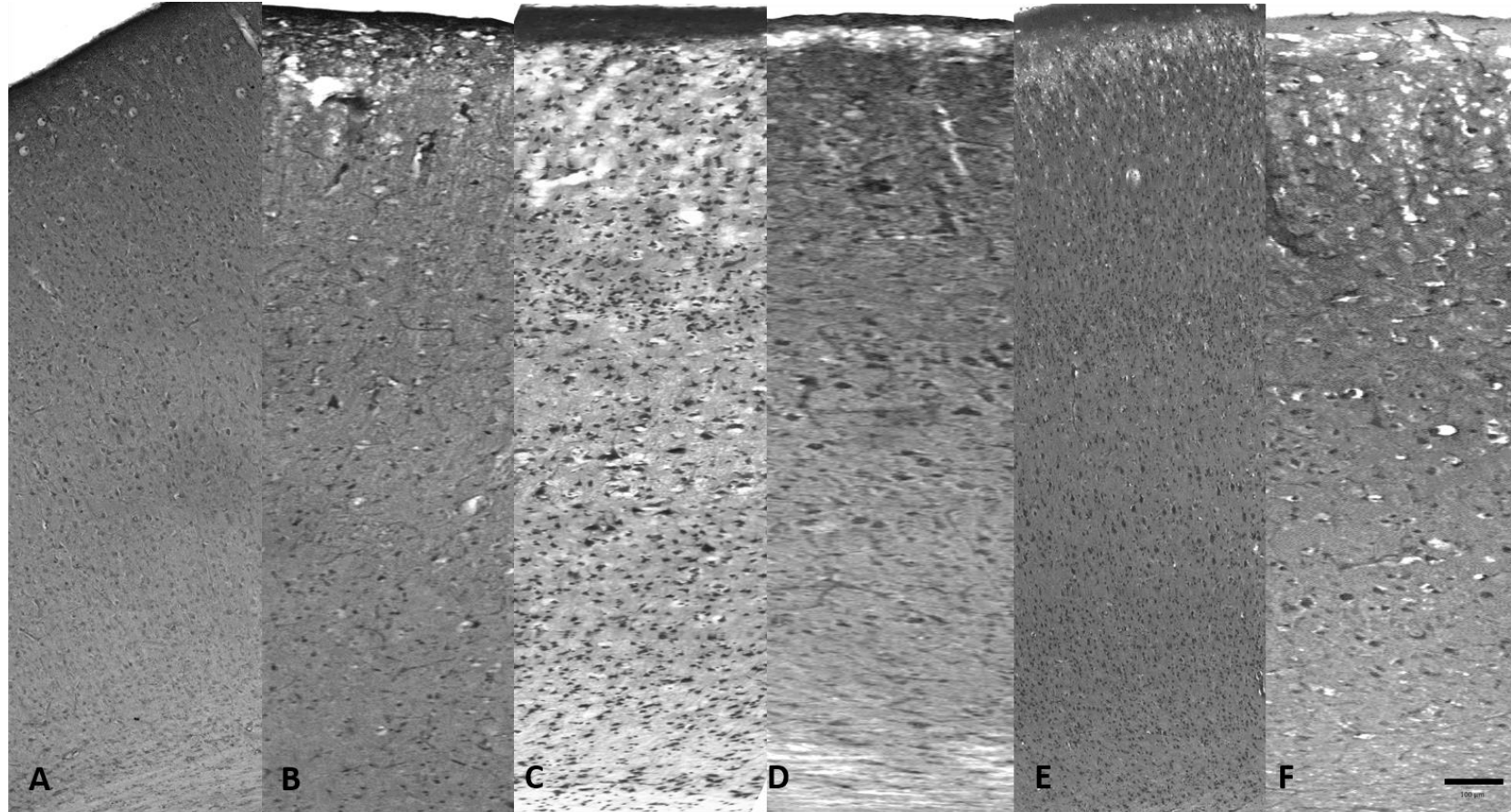
### **5.4.1 Datos Descriptivos de la expresión de APP N-terminal**

Se evidenció marcación positiva de APP N-terminal en todos los tiempos de cultivo para los grupos A, B, C y D.

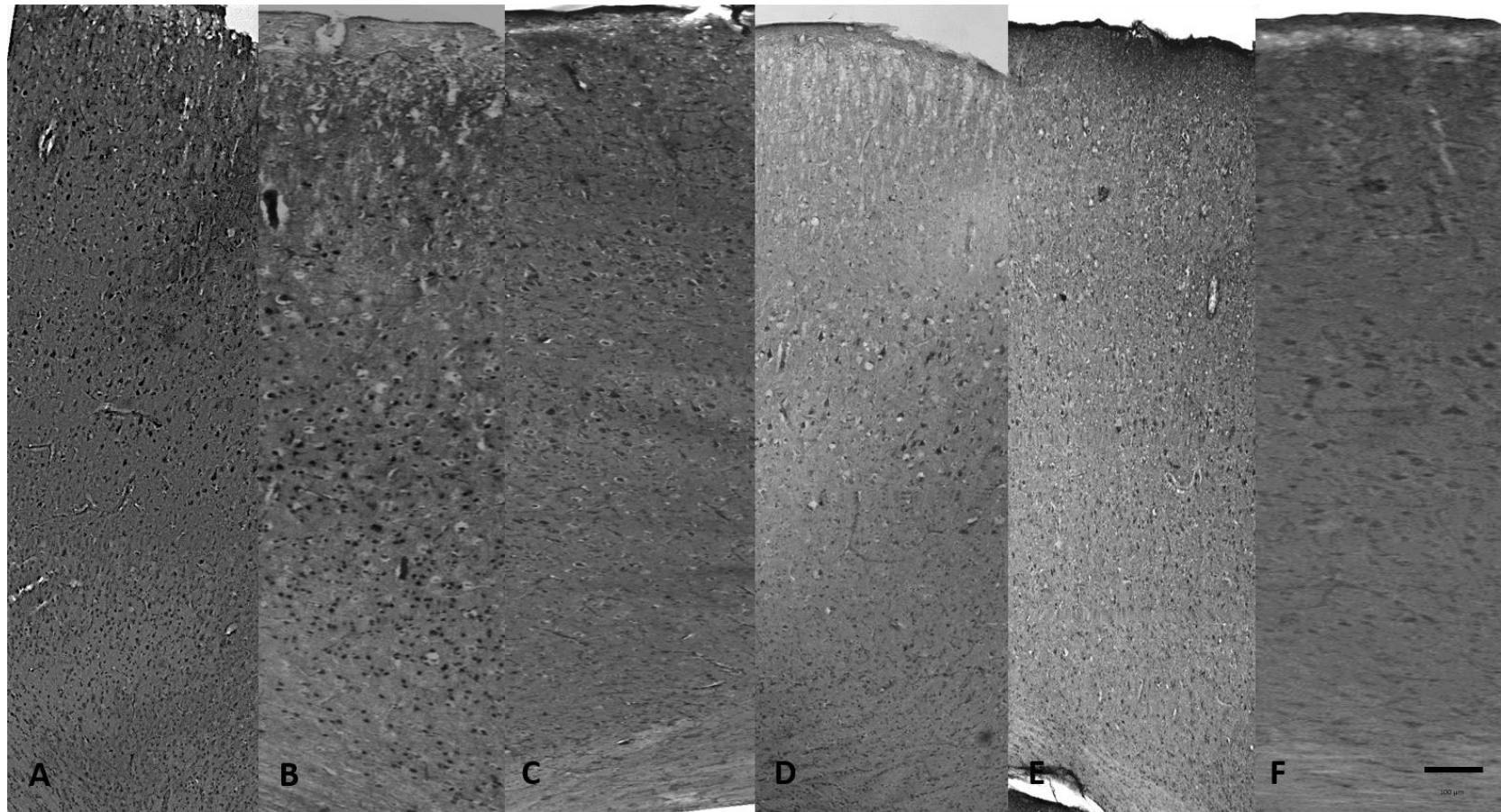
Esta marcación fue generalizada a lo largo de la corteza tanto motora como sensorial, sin embargo, esta marcación es más notoria en láminas III y V para los grupos A y C. En los grupos B y D la densidad celular marcada fue menor. (Figuras 28, 29, 30 y 31)

Para evaluar la marcación de APP N-terminal y la evolución de la lesión en el hipocampo, esta región fue dividida también para su análisis, en 4 estructuras las cuales son: CA1, CA3, Giro Dentado e Hilus. (Figuras 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 y 39)

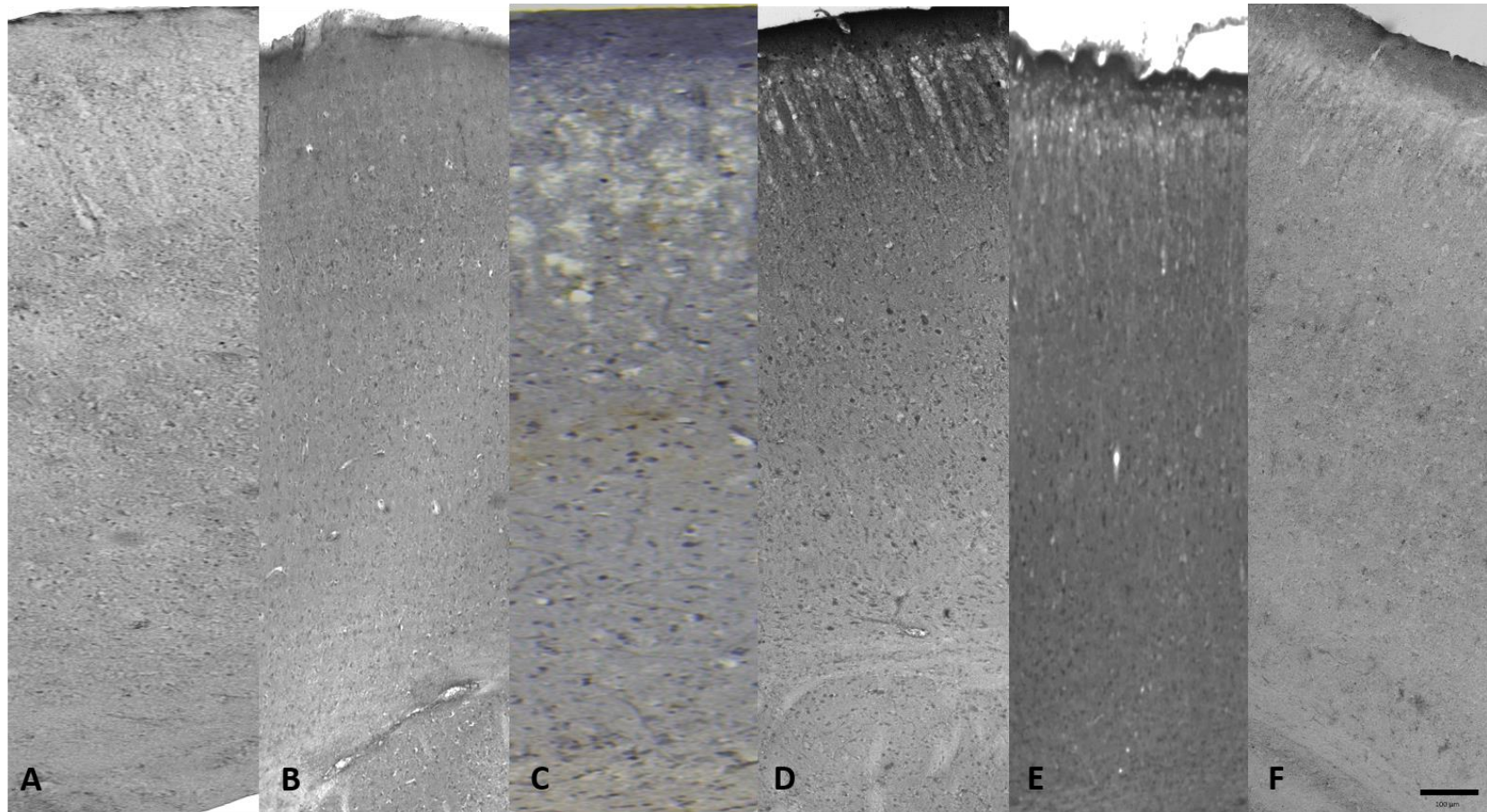
La marcación positiva de APP N-terminal en el hipocampo se caracterizó por ser generalmente mayor en los grupos A y C (lesionados)



**Figura 28.** APP N-terminal; Corteza Motora - 48 horas post-TCE. Se puede observar la marcación del extremo N-terminal de APP durante los diferentes tiempos de cultivo: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.

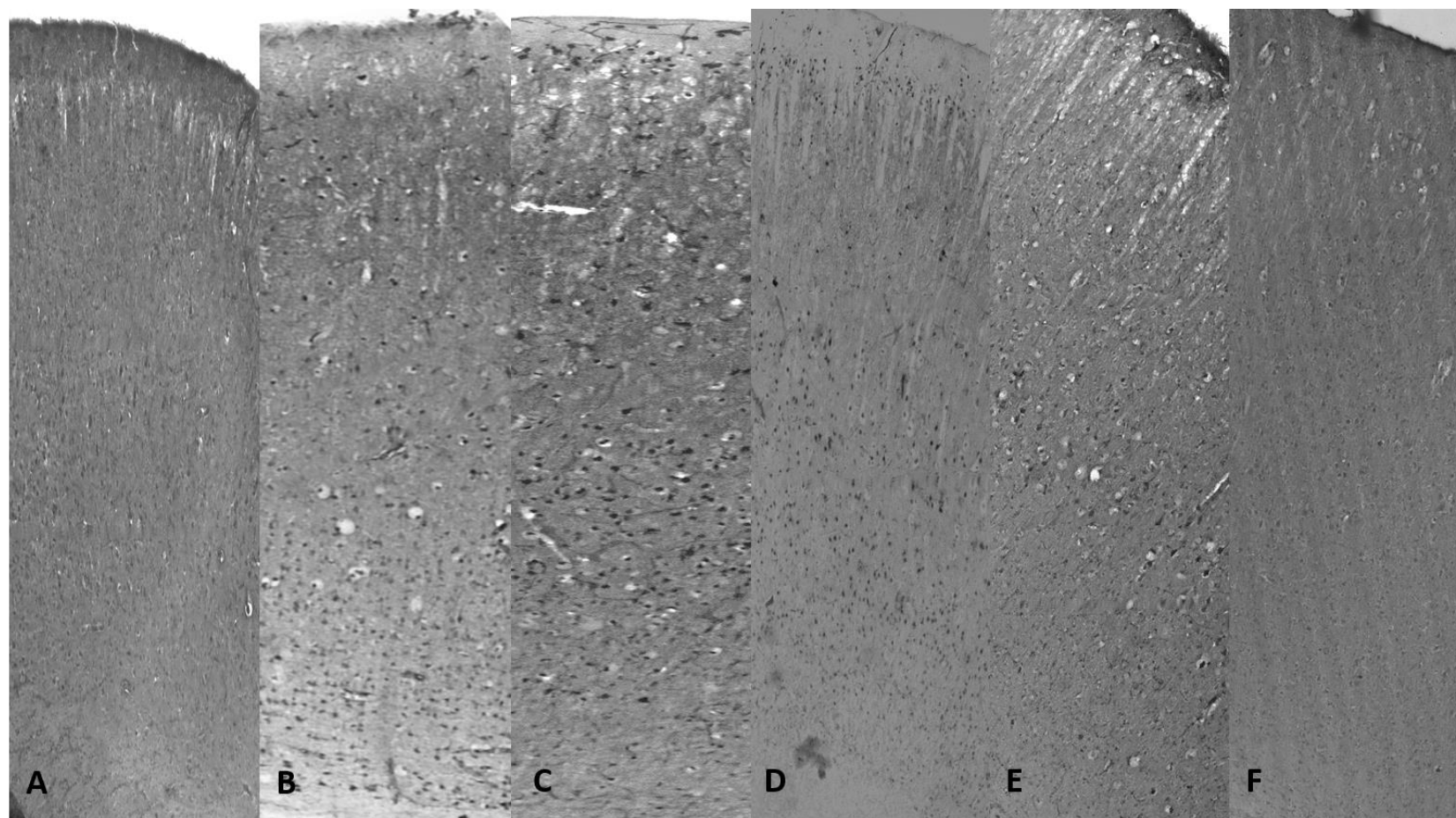


**Figura 29.** APP N-terminal; Corteza Motora - 72 horas post-TCE. Se puede observar la marcación del extremo N-terminal de APP durante los diferentes tiempos de cultivo: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100 µm.

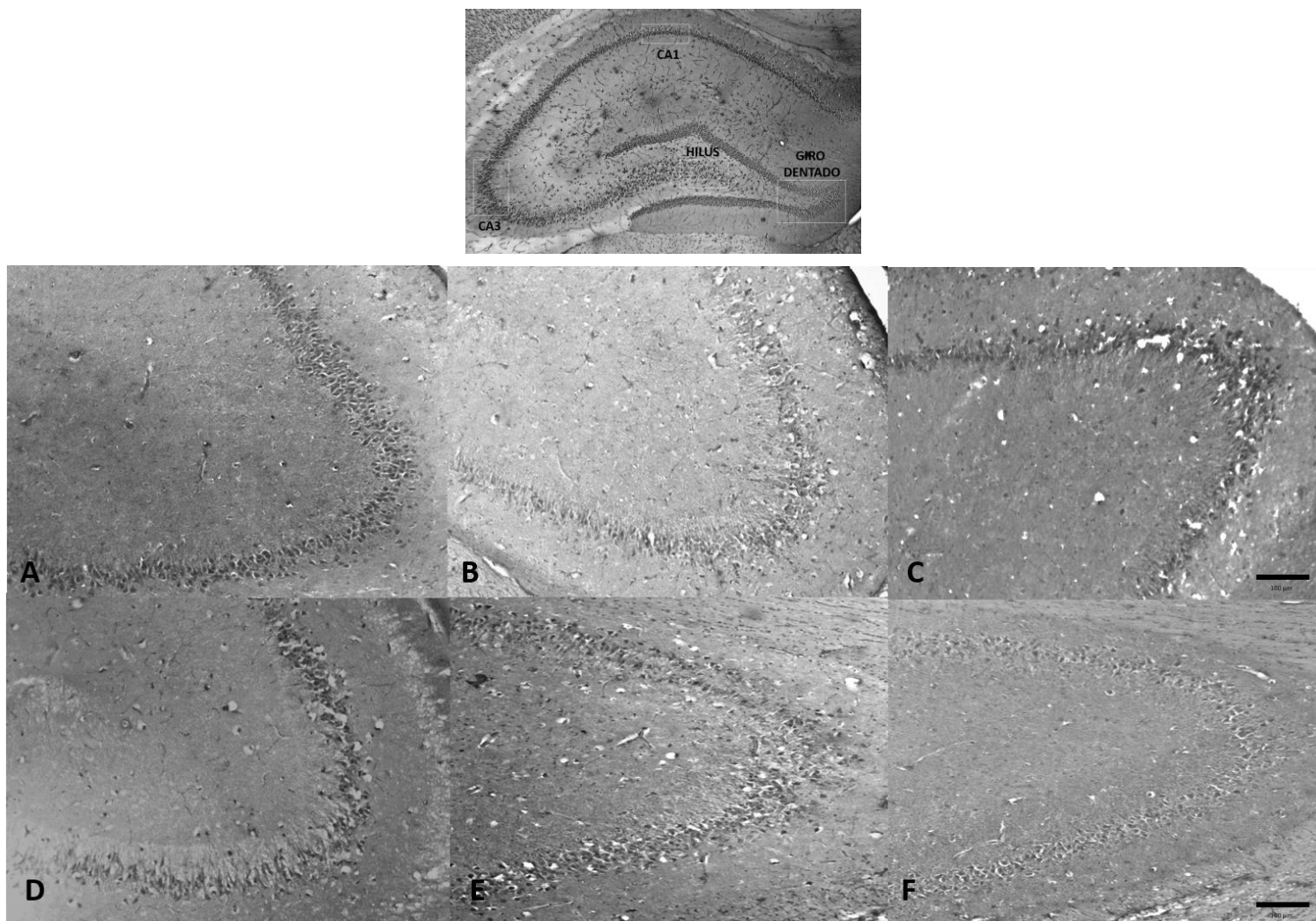


**Figura 30.** APP N-terminal; Corteza Sensorial - 48 horas post-TCE. Se puede observar la marcación del extremo N-terminal de APP durante los diferentes tiempos de cultivo: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100 µm.

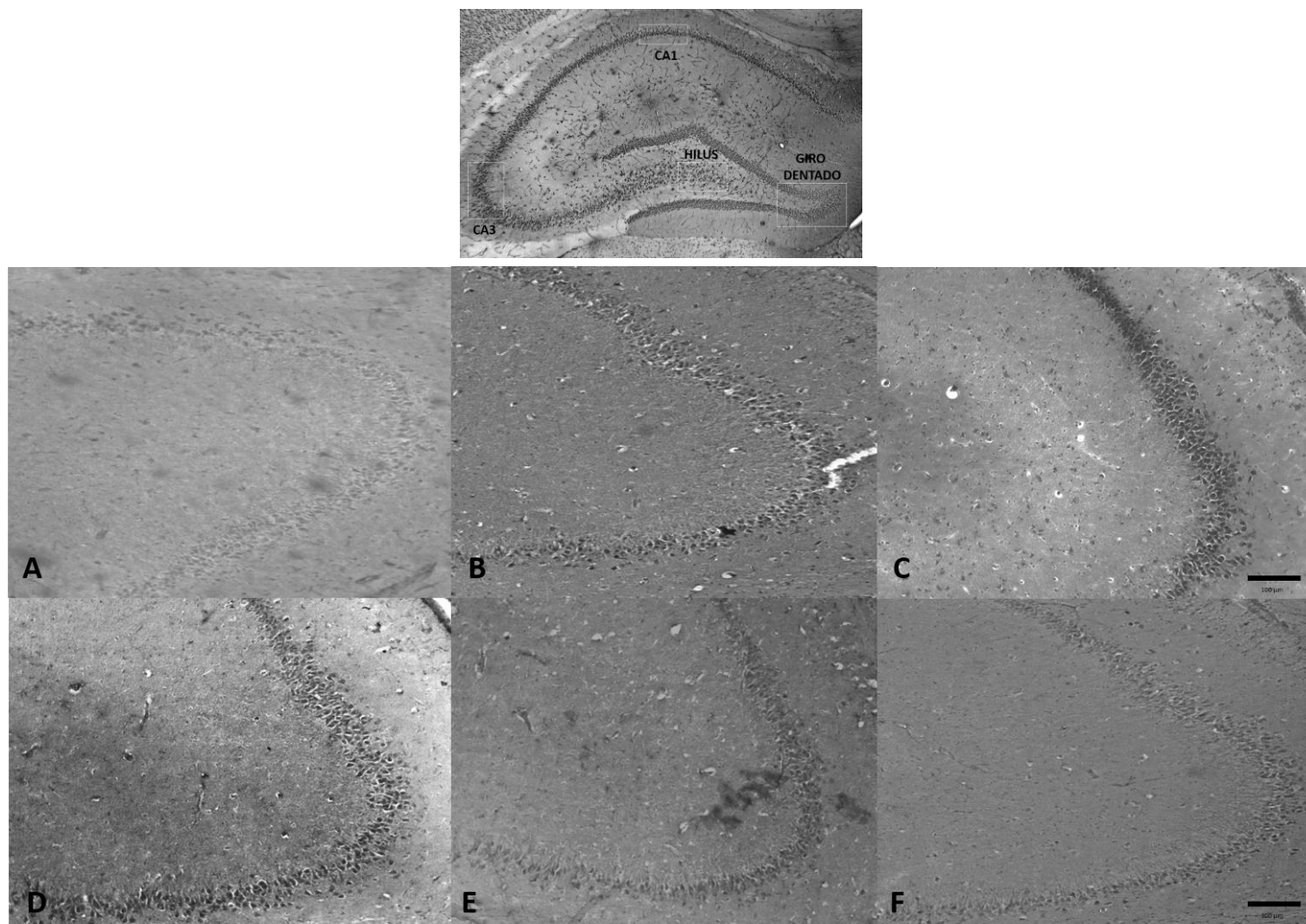




**Figura 31.** APP N-terminal; Corteza Sensorial - 72 horas post-TCE. Se puede observar la marcación del extremo N-terminal de APP durante los diferentes tiempos de cultivo: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.

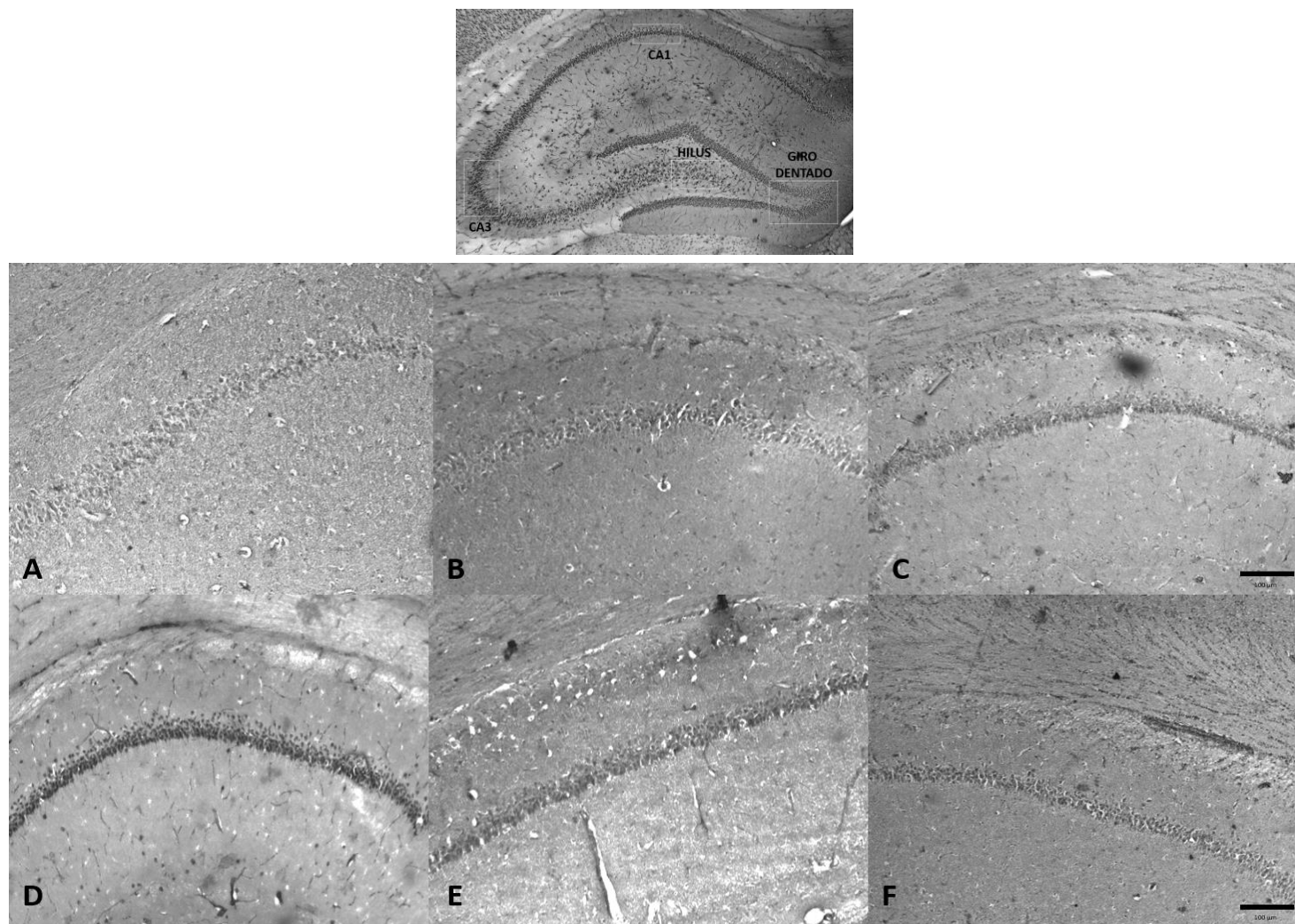


**Figura 32.** APP N-terminal; Hipocampo – CA3 – 48 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.

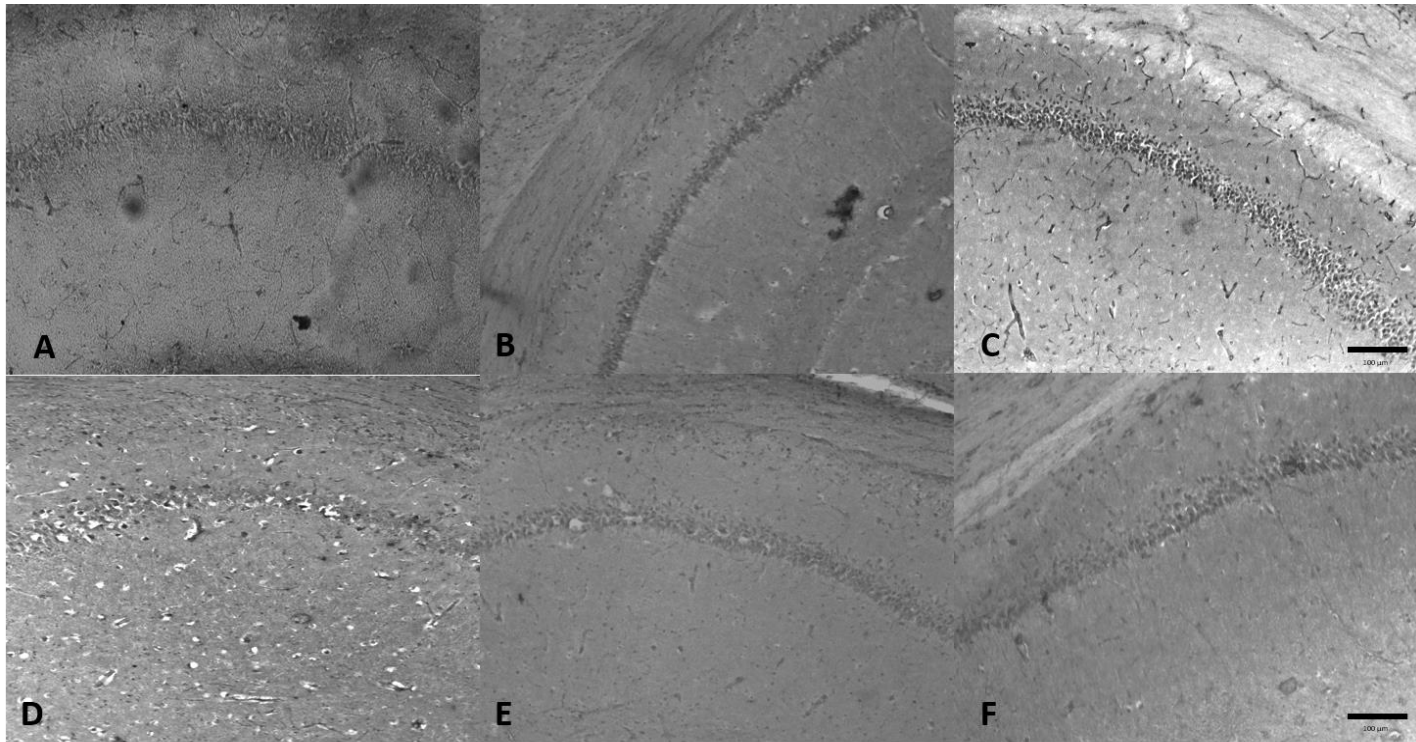
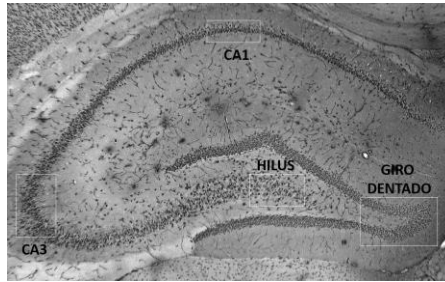


**Figura 33.** APP N-terminal; Hipocampo – CA3 – 72 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100 μm.

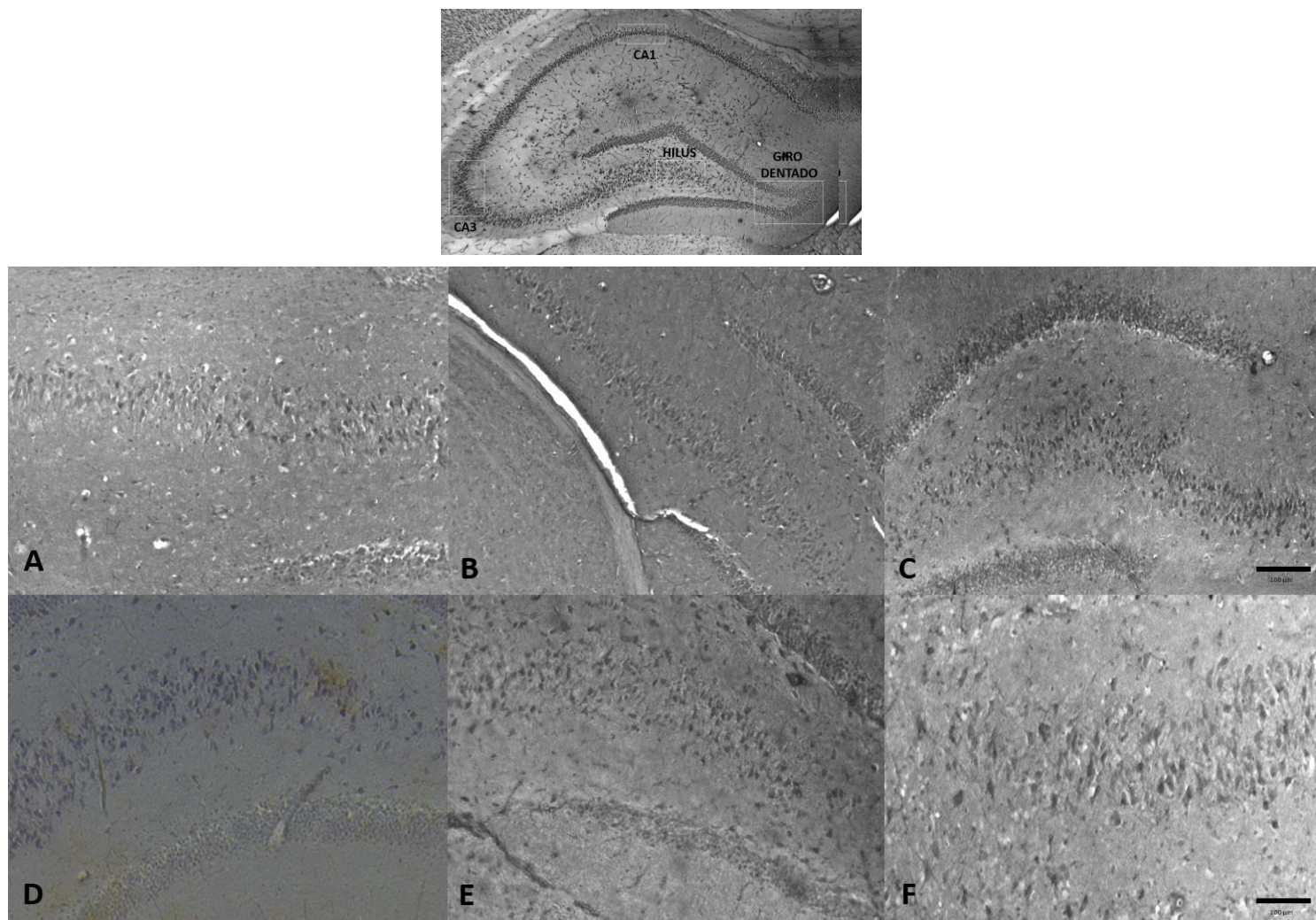




**Figura 34.** APP N-terminal; Hipocampo – CA1 – 48 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100 µm.

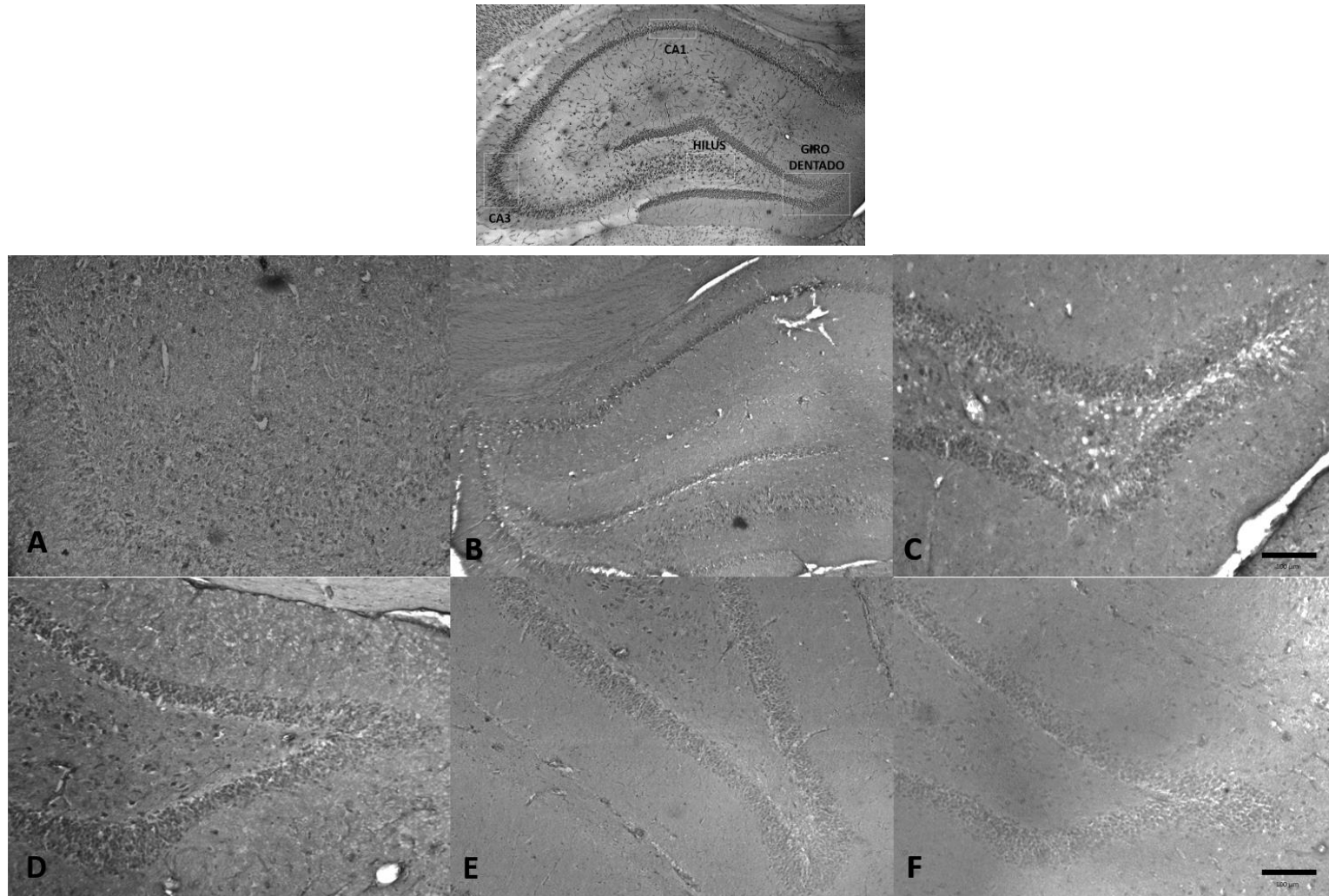


**Figura 35.** APP N-terminal; Hipocampo – CA1 – 72 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu\text{m}$ .



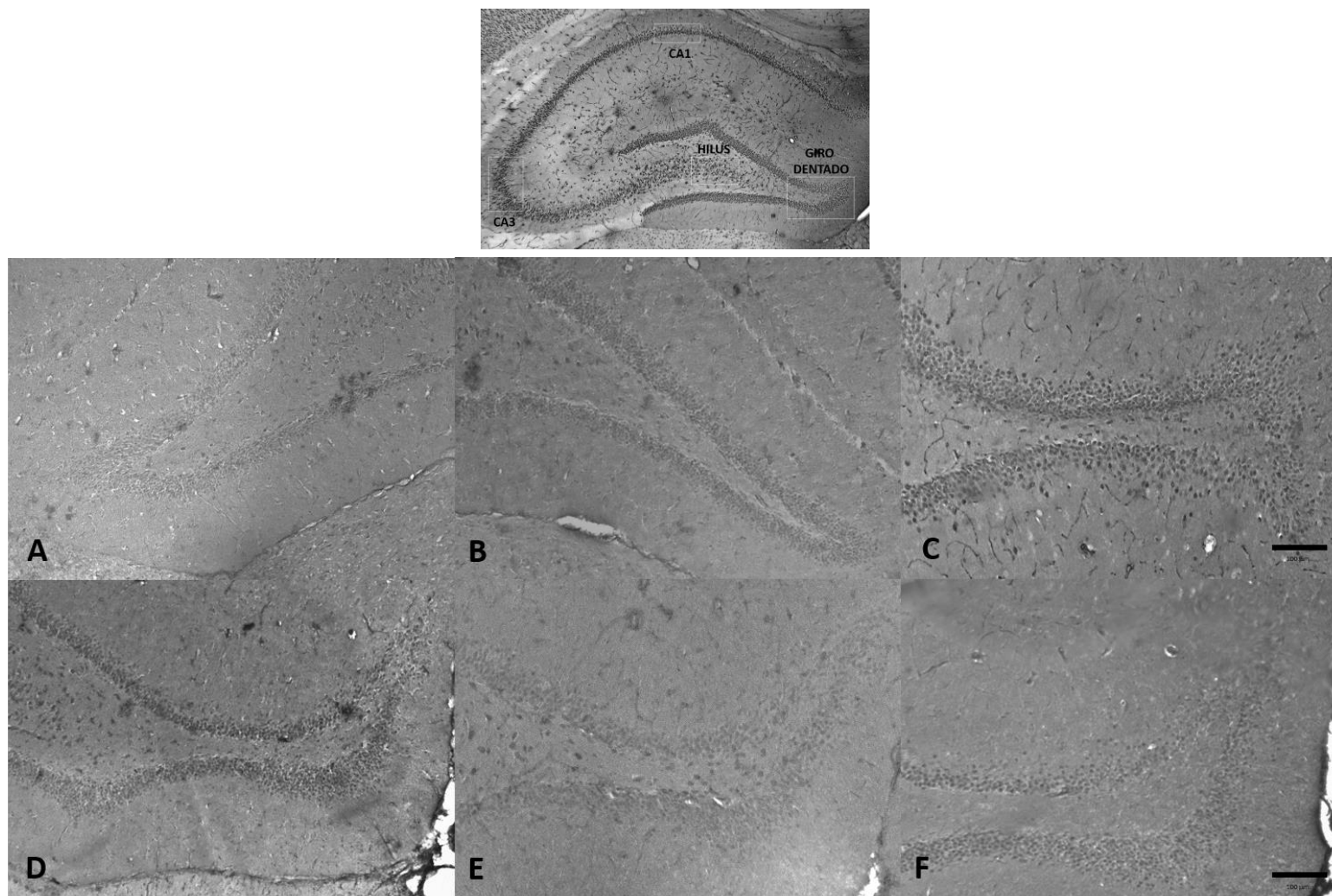
**Figura 36.** APP N-terminal; Hipocampo – HILUS – 48 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.

**Figura 37.** APP N-terminal; Hipocampo – HILUS – 72 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 38.** APP N-terminal; Hipocampo – Giro Dentado – 48 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.





**Figura 39.** APP N-terminal; Hipocampo – Giro Dentado – 72 horas post-TCE: **A.** Control 0 hr. cultivo. **B.** Trauma 0 hr. cultivo. **C.** Trauma 2 hr. cultivo. **D.** Trauma 4 hr. cultivo. **E.** Trauma 6 hr. cultivo. **F.** Trauma 8 hr. cultivo. Objetivo 10X. Barra 100  $\mu$ m.

### 5.4.2 Datos Cuantitativos de la expresión de APP N-terminal

La expresión de APP N-terminal a través del tiempo de cultivo presentó un comportamiento diferente al de NeuN, en el que se puede resaltar una tendencia a aumentar hasta alcanzar un punto máximo de expresión y luego decrecer hasta llegar nuevamente a valores basales en la mayoría de las regiones analizadas. A continuación se enunciarán los aspectos más relevantes de cada región estudiada:

- **CA3**

El análisis bivariado (Inmunoreactividad Vs. Tiempo de cultivo) describe una tendencia en la expresión de APP N-terminal, como ya se dijo, a aumentar hasta alcanzar un punto máximo y a partir de ahí decrecer. Para los grupos A y B se observa un pico de máxima expresión alrededor de las 4 horas de cultivo, sin embargo el grupo A presenta una mayor inmunoreactividad que B. Para los grupos C y D el pico de máxima expresión está alrededor de las 2 horas de cultivo, siendo mayor la inmunoreactividad en el grupo C. Esto demuestra que los sujetos lesionados tanto del grupo A y C presentan una mayor expresión de APP N-terminal comparado con los controles. (Figura 40).

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la Inmunoreactividad de APP N-terminal entre el grupo A Vs. el grupo B ( $p < 0.0001$ ) y entre el grupo C Vs. grupo D ( $p < 0.0001$ ), siendo mayor la expresión de APP N-terminal en los sujetos que fueron lesionados (Grupos B y D) respecto a cada uno de sus grupos control (A y C) como se citó anteriormente (Figura 41).

Al realizar el ANOVA a dos vías, se encontró que la variable trauma explicaba en mayor medida los cambios en la Inmunoreactividad de la proteína APP N-terminal, siendo el porcentaje de variabilidad de la varianza total explicada por el trauma de



un 39.86% y el porcentaje de variabilidad explicado por el tiempo de cultivo fue del 25.32% (Tabla 7).

**Tabla 7.** ANOVA a dos vías. CA3 – APP N-terminal

<b>Two-way RM ANOVA CA3 - APP N-terminal (Alpha = 0.05)</b>							
<b>Source of Variation</b>	<b>% of total variation</b>	<b>P value</b>	<b>Significant?</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>
<i>Interaction</i>	33.29	P < 0.0001	Yes	5457	12	454.8	F (12, 48) = 92.68
<i>Time</i>	25.32	P < 0.0001	Yes	4151	4	1038	F (4, 48) = 211.5
<i>Column Factor</i>	39.86	P < 0.0001	Yes	6534	3	2178	F (3, 12) = 1704
<i>Subjects (matching)</i>	0.09357	P = 0.9927	No	15.34	12	1.278	F (12, 48) = 0.2605
<i>Residual</i>				235.5	48	4.907	

Al realizar el análisis multivariado para los diferentes tiempos de cultivo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B en todos los tiempos de cultivo 0, 2, 4, 6 y 8 horas, con un p valor p=0.030, p=0.011, p=0.000, p=0.000 y p=0.000) respectivamente, lo que indica que los sujetos que sufrieron lesión (grupo A) presentaron una mayor expresión de la proteína APP N-terminal, comparado con los sujetos control (grupo B). Entre los grupos C y D se encontraron diferencias significativas en los tiempos de cultivo 0, 2 y 4 horas, con un p valor p=0.031, p=0.000 y p=0.015 respectivamente. Esto quiere decir que los sujetos que sufrieron lesión (grupo C) presentaron una mayor expresión de la proteína APP N-terminal, comparado con los sujetos control (grupo D). En los demás tiempos de cultivo 6 y 8 horas, no se encontraron diferencias significativas, p=0.054 y p=0.118 respectivamente, siendo la expresión de APP N-terminal similar en ambos grupos. (Anexo 7 y 8)

- **CA1**

El análisis bivariado (Inmunoreactividad Vs. Tiempo de cultivo) mostró que para los grupos A y B se observó un pico de máxima expresión alrededor de las 4 horas de cultivo, sin embargo el grupo A presenta una mayor inmunoreactividad que B. Para los grupos C y D el pico de máxima expresión está alrededor de las 2 horas de cultivo, siendo mayor la inmunoreactividad en el grupo C. Esto demuestra que

los sujetos lesionados tanto del grupo A y C presentan una mayor expresión de APP N-terminal comparado con los controles. (Figura 40).

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la Inmunoreactividad de APP N-terminal entre el grupo A Vs. el grupo B ( $p < 0.0001$ ) y entre el grupo C Vs. grupo D ( $p < 0.0001$ ), siendo mayor la expresión de APP N-terminal en los sujetos que fueron lesionados (Grupos B y D) respecto a cada uno de sus grupos control (A y C) como se citó anteriormente (Figura 41).

Al realizar el ANOVA a dos vías, se encontró que la variable tiempo de cultivo explicaba en mayor medida los cambios en la Inmunoreactividad de la proteína APP N-terminal, siendo el porcentaje de variabilidad de la varianza total explicada por el tiempo de cultivo de un 41.94% y el porcentaje de variabilidad explicado por el trauma fue del 26.70% (Tabla 8).

**Tabla 8.** ANOVA a dos vías. CA1 – APP N-terminal

<b>Two-way RM ANOVA CA1 - APP N-terminal (Alpha = 0.05)</b>							
<b>Source of Variation</b>	<b>% of total variation</b>	<b>P value</b>	<b>Significant?</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>
<i>Interaction</i>	30.75	$P < 0.0001$	Yes	5519	12	459.9	$F (12, 48) = 217.4$
<i>Time</i>	41.94	$P < 0.0001$	Yes	7527	4	1882	$F (4, 48) = 889.5$
<i>Column Factor</i>	26.7	$P < 0.0001$	Yes	4793	3	1598	$F (3, 12) = 2310$
<i>Subjects (matching)</i>	0.04624	$P = 0.9805$	No	8.3	12	0.6916	$F (12, 48) = 0.3269$
<i>Residual</i>				101.6	48	2.116	

Al realizar el análisis multivariado para los diferentes tiempos de cultivo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B en todos los tiempos de cultivo 0, 2, 4, 6 y 8 horas,  $p=0.000$ ,  $p=0.000$ ,  $p=0.000$ ,  $p=0.000$  y  $p=0.000$  respectivamente. Esto quiere decir que los sujetos que sufrieron lesión (grupo A) presentaron una mayor expresión de la proteína APP N-terminal, comparado con los sujetos control (grupo B). Entre los grupos C y D Se encontraron diferencias significativas en los tiempos de cultivo 0, 2, 4 y 6 horas,  $p=0.000$ ,  $p=0.000$ ,  $p=0.000$  y  $p=0.000$  respectivamente, lo cual indica que los sujetos que sufrieron lesión (grupo C) presentaron una mayor expresión de la

proteína APP N-terminal comparado con los sujetos control (grupo D). A las 8 horas de cultivo  $p=0.332$ , no se encontraron diferencias significativas. (Anexo 7 y 8)

- **Hilus**

El análisis bivariado (Inmunoreactividad Vs. Tiempo de cultivo) mostró que para los grupos A y B se observó un pico de máxima expresión alrededor de las 4 horas de cultivo, sin embargo el grupo A presenta una mayor inmunoreactividad que B. Los grupos C y D presentaron un comportamiento más bien constante a lo largo de los tiempos de cultivo, con un leve aumento alrededor de las 2 horas de cultivo, siendo mayor la inmunoreactividad en el grupo C. Esto demuestra que los sujetos lesionados tanto del grupo A y C presentan una mayor expresión de APP N-terminal comparado con los controles. (Figura 40).

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la Inmunoreactividad de APP N-terminal entre el grupo A Vs. el grupo B ( $p<0.0001$ ) y entre el grupo C Vs. el grupo D ( $p<0.0001$ ), siendo mayor la expresión de APP N-terminal en los sujetos que fueron lesionados (Grupos B y D) respecto a cada uno de sus grupos control (A y C) como se citó anteriormente (Figura 41).

Al realizar el ANOVA a dos vías, se encontró que la variable trauma explicaba en mayor medida los cambios en la Inmunoreactividad de la proteína APP N-terminal, siendo el porcentaje de variabilidad de la varianza total explicada por el trauma de un 32.74% y el porcentaje de variabilidad explicado por el tiempo de cultivo fue del 26.65% (Tabla 9).

**Tabla 9.** ANOVA a dos vías. Hilus – APP N-terminal

Two-way RM ANOVA Hilus - APP N-terminal (Alpha = 0.05)							
Source of Variation	% of total variation	P value	Significant?	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
Interaction	40.02	P < 0.0001	Yes	3007	12	250.6	F (12, 48) = 334.7
Time	26.65	P < 0.0001	Yes	2002	4	500.5	F (4, 48) = 668.5
Column Factor	32.74	P < 0.0001	Yes	2460	3	819.9	F (3, 12) = 1122
Subjects (matching)	0.1167	P = 0.4840	No	8.772	12	0.731	F (12, 48) = 0.9763
Residual				35.94	48	0.7487	

Al realizar el análisis multivariado para los diferentes tiempos de cultivo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B en los tiempos de cultivo 4, 6 y 8 horas,  $p=0.000$ ,  $p=0.000$  y  $p=0.031$  respectivamente, esto quiere decir que los sujetos que sufrieron lesión (grupo A) presentaron una mayor expresión de la proteína APP N-terminal, comparado con los sujetos control (grupo B); en los demás tiempos de cultivo 0 y 2 horas, no se encontraron diferencias significativas,  $p=0.899$  y  $p=0.869$  respectivamente, siendo la expresión de APP N-terminal similar en ambos grupos. Entre los grupos C y D se encontraron diferencias significativas en los tiempos de cultivo 0, 2 y 4 horas,  $p=0.019$ ,  $p=0.001$  y  $p=0.034$  respectivamente, lo cual indica que los sujetos que sufrieron lesión (grupo C) presentaron una mayor expresión de la proteína APP N-terminal comparado con los sujetos control (grupo D). En los demás tiempos de cultivo 6 y 8 horas, no se encontraron diferencias significativas,  $p=0.890$  y  $p=0.927$  respectivamente, siendo la expresión de APP N-terminal similar en ambos grupos (Anexo 7 y 8)

- **Giro Dentado**

El análisis bivariado (Inmunoreactividad Vs. Tiempo de cultivo) mostró que los grupos A y B presentaron un comportamiento más bien constante a lo largo de los tiempos de cultivo, con un leve aumento alrededor de las 4 horas de cultivo, siendo mayor la inmunoreactividad en el grupo A. Los grupos C y D presentaron un pico de máxima expresión alrededor de las 2 horas de cultivo, sin embargo el grupo C presentó una mayor inmunoreactividad que D. Esto demuestra que los

sujetos lesionados tanto del grupo A y C presentan una mayor expresión de APP N-terminal comparado con los controles. (Figura 40).

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la Inmunoreactividad de APP N-terminal entre el grupo A Vs. el grupo B ( $p < 0.0001$ ) y entre el grupo C Vs. el grupo D ( $p < 0.0001$ ), siendo mayor la expresión de APP N-terminal en los sujetos que fueron lesionados (Grupos B y D) respecto a cada uno de sus grupos control (A y C) como se citó anteriormente (Figura 41)

Al realizar el ANOVA a dos vías, se encontró que la variable tiempo de cultivo explica en mayor medida los cambios en la Inmunoreactividad de la proteína APP N-terminal, siendo el porcentaje de variabilidad de la varianza total explicada por el tiempo de cultivo de un 37.32% y el porcentaje de variabilidad explicado por el tiempo de cultivo fue del 32.16% (Tabla 10).

**Tabla 10.** ANOVA a dos vías. Giro Dentado – APP N-terminal

<b>Two-way RM ANOVA Giro Dentado - APP N-terminal (Alpha = 0.05)</b>							
<b>Source of Variation</b>	<b>% of total variation</b>	<b>P value</b>	<b>Significant?</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>
<i>Interaction</i>	29.12	$P < 0.0001$	Yes	3428	12	285.7	$F(12, 48) = 94.17$
<i>Time</i>	37.32	$P < 0.0001$	Yes	4394	4	1098	$F(4, 48) = 362.1$
<i>Column Factor</i>	32.16	$P < 0.0001$	Yes	3786	3	1262	$F(3, 12) = 854.3$
<i>Subjects (matching)</i>	0.1506	$P = 0.9125$	No	17.73	12	1.477	$F(12, 48) = 0.4870$
<i>Residual</i>				145.6	48	3.034	

Al realizar el análisis multivariado para los diferentes tiempos de cultivo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos A y B solamente a las 4 horas de cultivo,  $p = 0.004$ , esto quiere decir que los sujetos que sufrieron lesión (grupo A) presentaron una mayor expresión de la proteína APP N-terminal, comparado con los sujetos control (grupo B); en los demás tiempos de cultivo 0, 2, 6 y 8 horas  $p = 0.276$ ,  $p = 0.172$ ,  $p = 0.682$ ,  $p = 0.999$  y  $p = 0.989$  respectivamente, no se encontraron diferencias significativas siendo la expresión de APP N-terminal similar en ambos grupos. Entre los grupos C y D se encontraron diferencias significativas en los tiempos de cultivo 0, 2 y 4 horas,

$p=0.004$ ,  $p=0.000$  y  $p=0.006$  respectivamente, lo cual indica que los sujetos que sufrieron lesión (grupo C) presentaron una mayor expresión de la proteína APP N-terminal comparado con los sujetos control (grupo D). En los demás tiempos de cultivo 6 y 8 horas, no se encontraron diferencias significativas,  $p=0.579$  y  $p=0.680$  respectivamente, siendo la expresión de APP N-terminal similar en ambos grupos (Anexo 7 y 8)

- **Corteza Motora**

En la Corteza Motora, el análisis bivariado (Inmunoreactividad Vs. Tiempo de cultivo) describe una relación inversamente proporcional entre estas dos variables, es decir, que a mayor tiempo de cultivo se encontró una menor Inmunoreactividad de la proteína APP N-terminal, sin embargo se pueden observar unos leves aumentos o picos en su expresión. La relación descrita fue igual en los cuatro grupos experimentales (A, B, C y D). (Figura 40)

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la Inmunoreactividad de APP N-terminal entre el grupo A Vs. el grupo B ( $p<0.0001$ ) y entre el grupo C Vs. grupo D ( $p<0.0001$ ), siendo mayor la expresión de APP N-terminal en los sujetos que fueron lesionados (Grupos B y D) respecto a cada uno de sus grupos control (A y C) (Figura 41).

Al realizar el ANOVA a dos vías, se encontró que la variable tiempo de cultivo explicaba en mayor medida los cambios en la Inmunoreactividad de la proteína APP N-terminal, siendo el porcentaje de variabilidad de la varianza total explicada por el tiempo de cultivo de un 31.85% y el porcentaje de variabilidad explicado por el trauma fue del 13.85% (Tabla 11).

**Tabla 11.** ANOVA a dos vías. Corteza Motora – APP N-terminal

<b>Two-way RM ANOVA Corteza Motora - APP N-terminal (Alpha = 0.05)</b>							
<b>Source of Variation</b>	<b>% of total variation</b>	<b>P value</b>	<b>Significant?</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>
<i>Interaction</i>	7.802	P = 0.3626	No	11329	12	944.1	F (12, 48) = 1.126
<i>Time</i>	31.85	P < 0.0001	Yes	46245	4	11561	F (4, 48) = 13.79
<i>Column Factor</i>	13.85	P = 0.0757	No	20113	3	6704	F (3, 12) = 2.951
<i>Subjects (matching)</i>	18.78	P = 0.0071	Yes	27265	12	2272	F (12, 48) = 2.709
<i>Residual</i>				40256	48	838.7	

Al realizar el análisis multivariado para los diferentes tiempos de cultivo y haciendo una distinción entre láminas supragranulares e infragranulares, se encontró que: Para los grupos A y B, en láminas supragranulares, se encontraron diferencias significativas solamente a las 2 horas de cultivo,  $p=0.000$ . Esto quiere decir que los sujetos que sufrieron lesión (grupo A) presentaron una mayor expresión de la proteína APP N-terminal, comparado con los sujetos control (grupo B); en los demás tiempos de cultivo 0, 4, 6 y 8 horas;  $p=0.438$ ,  $p=0.066$ ,  $p=0.997$  y  $p=0.895$  respectivamente, no se encontraron diferencias significativas siendo la expresión de APP N-terminal similar en ambos grupos. Para los mismos grupos A y B, pero en láminas Infragranulares no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos de cultivo 0, 2, 4, 6 y 8 horas;  $p=0.995$ ,  $p=1.000$ ,  $p=0.935$ ,  $p=1.000$  y  $p=0.273$  respectivamente, siendo la expresión de APP N-terminal similar en ambos grupos.

Para los grupos C y D en láminas supragranulares, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos de cultivo 0, 2, 4, 6 y 8 horas;  $p=0.995$ ,  $p=1.000$ ,  $p=0.935$ ,  $p=1.000$  y  $p=0.273$  respectivamente, siendo la expresión de APP N-terminal similar en ambos grupos. En láminas infragranulares de los grupos C y D tampoco se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos de cultivo 0, 2, 4, 6 y 8 horas;  $p=0.995$ ,  $p=1.000$ ,  $p=0.935$ ,  $p=1.000$  y  $p=0.273$  respectivamente, siendo la expresión de APP N-terminal similar en ambos grupos. (Anexo 7 y 8)

- **Corteza Sensorial**

En la Corteza Sensorial, el análisis bivariado (Inmunoreactividad Vs. Tiempo de cultivo) describe una relación inversamente proporcional entre estas dos variables, es decir, que a mayor tiempo de cultivo se encontró una menor Inmunoreactividad de la proteína APP N-terminal, sin embargo se pueden observar unos leves aumentos o picos en su expresión. La relación descrita fue igual en los cuatro grupos experimentales (A, B, C y D). (Figura 40).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la Inmunoreactividad de APP N-terminal entre el grupo A Vs. el grupo B ( $p > 0.0001$ ) pero sí entre el grupo C Vs. grupo D ( $p < 0.0001$ ), siendo mayor la expresión de APP N-terminal en los sujetos que fueron lesionados (Grupos C) respecto a su control (grupo D) (Figura 41).

Al realizar el ANOVA a dos vías, se encontró que la variable tiempo de cultivo explicaba en mayor medida los cambios en la Inmunoreactividad de la proteína APP N-terminal, siendo el porcentaje de variabilidad de la varianza total explicada por el tiempo de cultivo de un 62.48% y el porcentaje de variabilidad explicado por el trauma fue del 15.20% (Tabla 12).

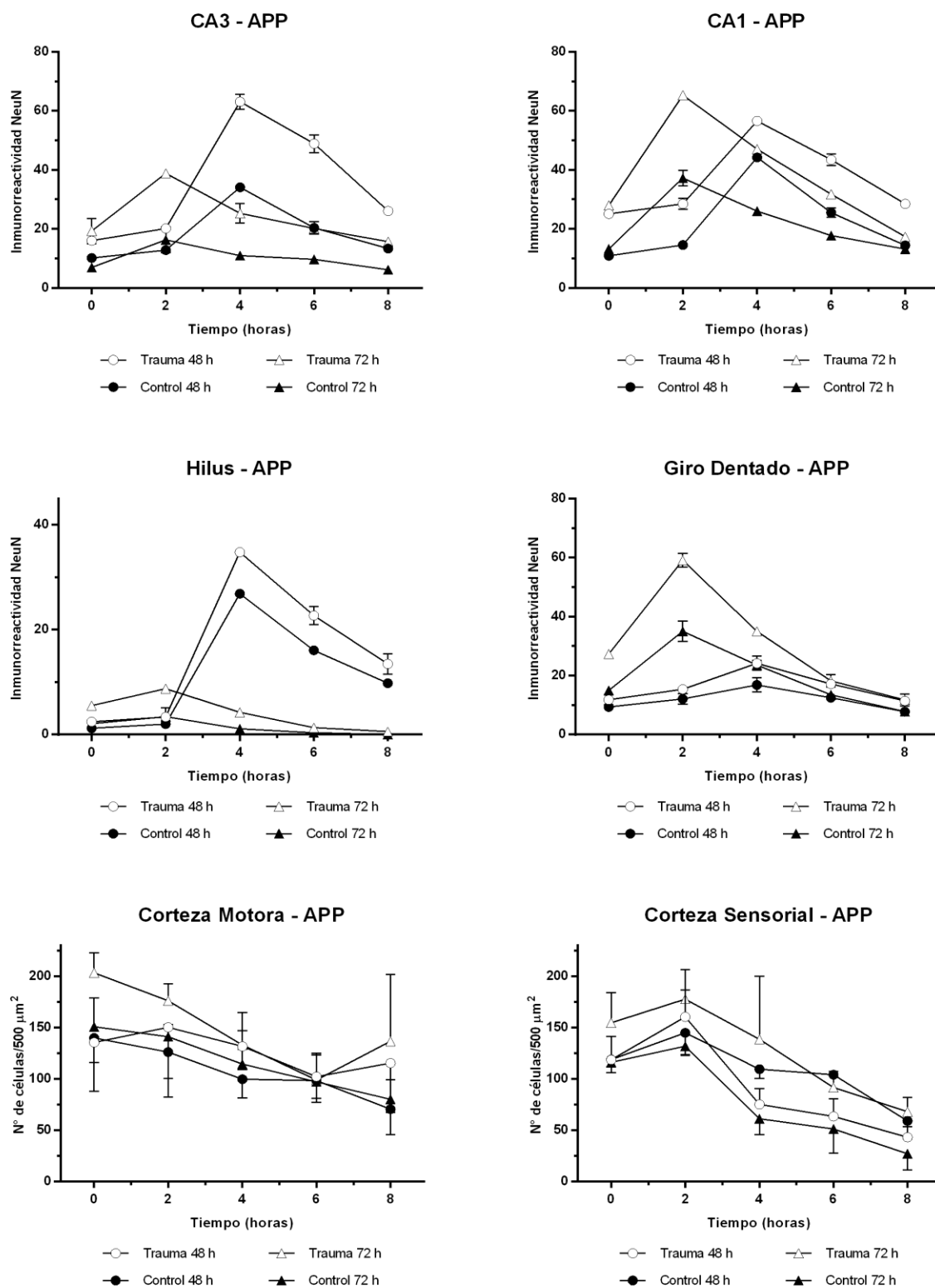
**Tabla 12.** ANOVA a dos vías. Corteza Sensorial – APP N-terminal

<b>Two-way RM ANOVA Corteza Sensorial - APP N-terminal (Alpha = 0.05)</b>							
<b>Source of Variation</b>	<b>% of total variation</b>	<b>P value</b>	<b>Significant?</b>	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F (DFn, DFd)</b>
<i>Interaction</i>	4.919	P = 0.0001	Yes	8432	12	702.6	F (12, 48) = 4.405
<i>Time</i>	62.48	P < 0.0001	Yes	107100	4	26775	F (4, 48) = 167.9
<i>Column Factor</i>	15.2	P = 0.0215	Yes	26052	3	8684	F (3, 12) = 4.701
<i>Subjects (matching)</i>	12.93	P < 0.0001	Yes	22168	12	1847	F (12, 48) = 11.58
<i>Residual</i>				7656	48	159.5	

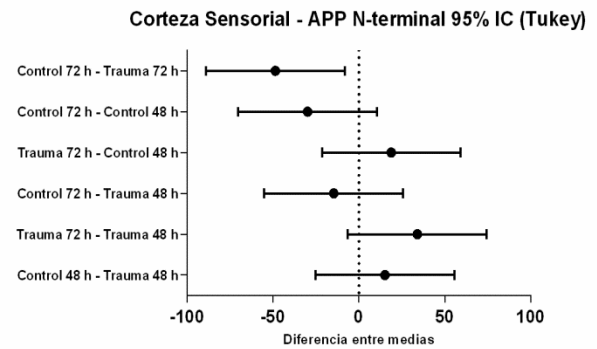
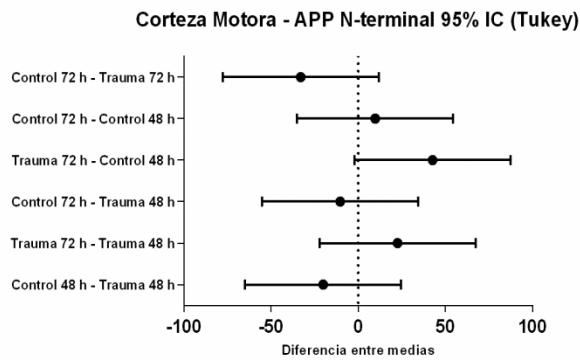
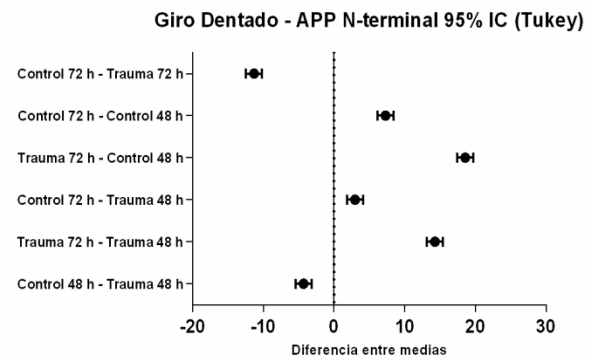
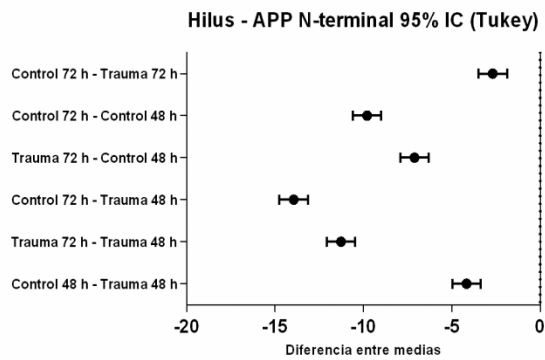
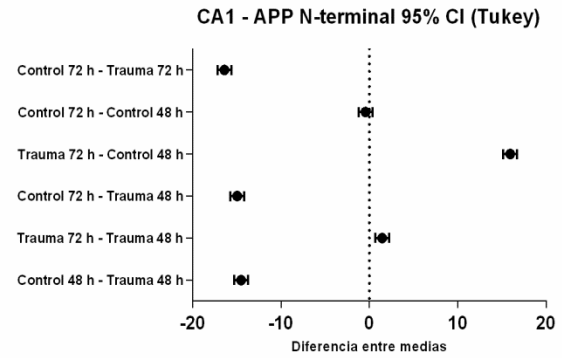
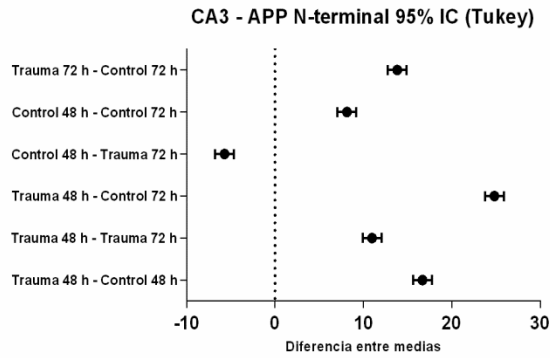
Al realizar el análisis multivariado para los diferentes tiempos de cultivo y haciendo una distinción entre láminas supragranulares e infragranulares, se encontró que: Para los grupos A y B, en láminas supragranulares, se encontraron diferencias



significativas a las 4 y 6 horas de cultivo,  $p=0.044$  y  $p=0.032$  respectivamente. Esto quiere decir que los sujetos que sufrieron lesión (grupo A) presentaron una mayor expresión de la proteína APP N-terminal, comparado con los sujetos control (grupo B); en los demás tiempos de cultivo 0, 2 y 8 horas;  $p=0.940$ ,  $p=0.176$  y  $p=0.105$  respectivamente, no se encontraron diferencias significativas siendo la expresión de APP N-terminal similar en ambos grupos. Para los mismos grupos A y B, pero en láminas Infragranulares se encontraron diferencias significativas a las 4 y 6 horas de cultivo,  $p=0.001$  y  $p=0.000$  respectivamente. Esto quiere decir que los sujetos que sufrieron lesión (grupo A) presentaron una mayor expresión de la proteína APP N-terminal, comparado con los sujetos control (grupo B); en los demás tiempos de cultivo 0, 2 y 8 horas;  $p=0.892$ ,  $p=0.791$  y  $p=0.892$  respectivamente, no se encontraron diferencias significativas siendo la expresión de APP N-terminal similar en ambos grupos. Para los grupos C y D en láminas supragranulares, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos de cultivo 0, 2, 4, 6 y 8 horas;  $p=0.995$ ,  $p=1.000$ ,  $p=0.935$ ,  $p=1.000$  y  $p=0.273$  respectivamente, siendo la expresión de APP N-terminal similar en ambos grupos. En láminas infragranulares de los grupos C y D se encontraron diferencias significativas en todos los tiempos 0, 2, 4, 6 y 8 horas de cultivo,  $p=0.000$ ,  $p=0.000$ ,  $p=0.000$  y  $p=0.001$  y  $p=0.000$  respectivamente, siendo la expresión de APP N-terminal mayor en los sujetos que sufrieron lesión (grupo A), comparado con los sujetos control (grupo B); en láminas infragranulares se encontraron diferencias significativas en los tiempos 2, 4, 6 y 8 horas de cultivo,  $p=0.019$ ,  $p=0.003$ ,  $p=0.000$  y  $p=0.001$  respectivamente, lo cual quiere decir que los sujetos que sufrieron lesión (grupo C) presentaron una mayor expresión de la proteína APP N-terminal, comparado con los sujetos control (grupo D). No se encontraron diferencias significativas a las 0 horas de cultivo,  $p=0.354$  siendo la expresión de APP N-terminal similar en ambos grupos. (Anexo 7 y 8)



**Figura 40.** Análisis bivariado: Inmunoreactividad APP N-terminal Vs. Tiempo de cultivo



**Figura 41.** Prueba post hoc de Tukey

## **5.5 Proteína precursora Amiloide (APP), extremo C-terminal**

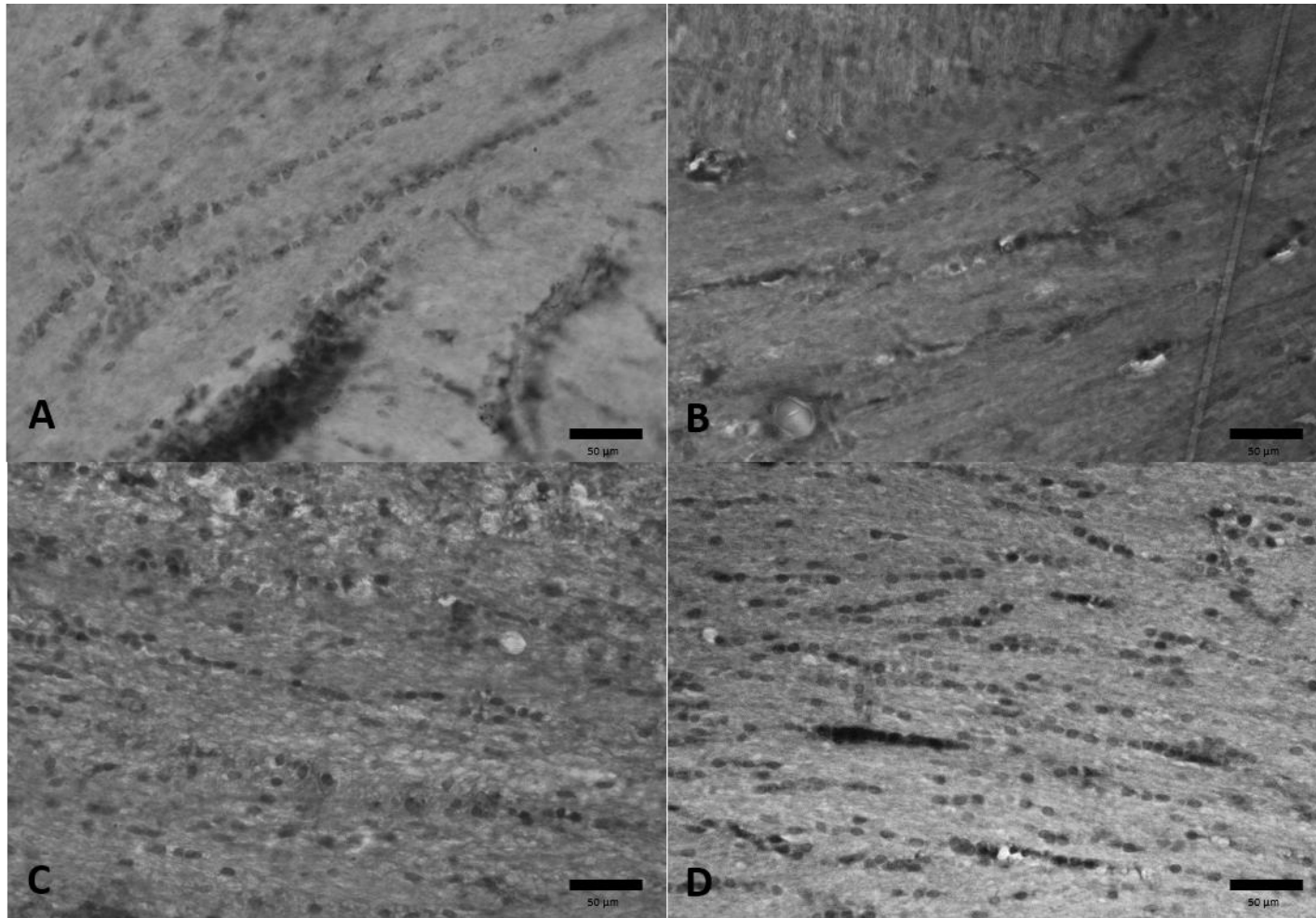
### **5.5.1 Datos Descriptivos de la expresión de APP C-terminal**

Se evidenció marcación positiva del extremo C-terminal de APP, en la sustancia blanca subcortical a las 6 y 8 horas de sujetos lesionados, siendo ésta similar a “acúmulos” de la proteína.

Esto fue visible en las fibras del cuerpo calloso y en algunos de los axones que conforman el alveus hipocampal. (Figura 42)

No se encontraron células positivas en las demás regiones analizadas ni en los sujetos utilizados como controles.

Al ser una marcación tenue y escasa, no se realizó cuantificación de ella. Sólo se muestran algunas imágenes representativas de la marcación positiva encontrada para este extremo.



**Figura 42.** APP C-terminal; Cuerpo Calloso. A. Trauma 6 hr. cultivo - 48 horas post-TCE. B. Trauma 8 hr. cultivo - 48 horas post-TCE C. Trauma 6 hr. cultivo - 72 horas post-TCE. D. Trauma 6 hr. cultivo - 72 horas post-TCE. Se observan “acúmulos” de la proteína a lo largo de las fibras que componen el cuerpo calloso. Objetivo 40X. Barra 50 µm.

## 6. DISCUSIÓN

A pesar de la abundante investigación realizada en las últimas décadas, todavía no se cuenta con ningún tratamiento específico y efectivo para el daño producido por un TCE, diferentes a las medidas generales que disminuyen las complicaciones como la evacuación quirúrgica de hematomas intracraneales con efecto de masa y un control estricto de la presión arterial y la presión intracraneal del paciente.

Los modelos experimentales se consideran en este momento la mejor herramienta para estudiar las múltiples alteraciones fisiopatológicas asociadas a TCE, especialmente a nivel celular y molecular, así como para la investigación de nuevas estrategias terapéuticas debido a que permiten analizar múltiples parámetros tanto fisiológicos, neuroquímicos, patológicos o de conducta cuyas modificaciones se hallan asociadas al desarrollo y progresión de cada tipo de lesión cerebral post-traumática.<sup>79</sup>

Nuestro grupo adoptó el modelo de impacto-aceleración por caída libre de un peso o Modelo de Marmarou como modelo experimental de investigación en TCE difuso, al cual se le realizaron varias modificaciones que se citan a continuación:

Primero que todo se realizó una variación en la cepa del biomodelo murino de *Sprague Dawley* a *Wistar* debido a que la primera no estaba disponible en nuestro biotério. Segundo, durante el proceso de estandarización del modelo se emplearon ratas con pesos entre 350-450 gr, sin embargo después de generar el trauma con 450 gr de peso a una altura de 2 metros sin intubación orotraqueal (respiración espontánea) la mortalidad fue cercana al 100% asociada a falla respiratoria y sangrados en fosa posterior.

Con el fin de generar un trauma moderado, se decidió buscar una altura superior a 1 metro e inferior a 2 metros que garantizara el 100% de sobrevida con respiración espontánea, características que fueron logradas a 1,55 metros de altura. Los biomodelos con trauma tardaron más en recuperar su estado de conciencia comparado con los controles (10-20 minutos). <sup>78</sup>

La cepa *Sprague-dawley* utilizada en el modelo original de Marmarou, ha sido reportada como una cepa más susceptible a la lesión en experimentos de isquemia cerebral, sin embargo, en trauma craneoencefálico se ha reportado como una cepa que presenta menor grado de severidad después de la lesión<sup>85-87</sup> a diferencia de la cepa *Wistar* utilizada por nosotros.

Se debe agregar que la cepa *Wistar* corresponde a un modelo confiable en investigación debido a sus características anatómicas y funcionales, además que bajo el control estricto de algunas variables como la edad, el sexo y el peso corporal, es posible conseguir resultados reproducibles y se garantiza una posible extrapolación de los resultados al modelo humano.<sup>88</sup> De todas formas estas diferencias entre la cepa *Wistar* y la cepa *Sprague- Dawley* pueden ser una fuente de variabilidad considerable y es extremadamente importante en la planificación de los experimentos.<sup>89</sup>

Por consiguiente, este modelo modificado de Marmarou fue adoptado debido a que permite obtener y observar la mayoría de los cambios patológicos ocurridos por TCE difuso y se considera que se obtiene una mayor aproximación a la heterogeneidad del trauma que se aprecia en humanos <sup>78</sup>; ya que la evidencia muestra que los pacientes con TCE difuso a pesar de no presentar muerte neuronal extensa desarrollan alteraciones cognitivas, comportamentales y motoras de larga data; además presentan mayor susceptibilidad para enfermedades neurodegenerativas, eventos cerebrovasculares o epilepsia entre otros. Estos hallazgos han sido explicados más por el compromiso de la sustancia blanca que

por exposición a las fuerzas externas propias de la cinética del evento que conduce a lesión axonal que puede ir desde compromiso del axolema únicamente hasta casos severos de deaferentación <sup>90</sup>

Sumado a este modelo de TCE, hemos adicionado una propuesta metodológica *ex-vivo*, para estudiar los fenómenos fisiopatológicos de la lesión secundaria en el TCE. Esta propuesta corresponde a cultivos organotípicos de tajadas cerebrales, los cuales se han convertido en otra herramienta experimental muy útil y aceptada en el campo de las neurociencias. El hecho de que las tajadas mantienen en parte su integridad estructural, a diferencia de los cultivos celulares, permite el estudio de circuitos específicos y de redes cerebrales de manera aislada. <sup>91</sup>

Además, los cultivos organotípicos agudos permiten reducir notablemente el número de animales experimentales lo cual contribuye significativamente con los parámetros establecidos por el *NC3RS - National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research*, para la reducción, refinación y reemplazo de animales en investigación (3Rs).<sup>92</sup> Entre las limitaciones que se presentan cuando se emplean cultivos organotípicos agudos es el hecho de que no se representa totalmente el sistema vascular y los capilares que aunque se ha demostrado sobreviven en las secciones cultivadas, no son funcionales y pueden liberar sustancias tóxicas que aceleran el proceso de muerte celular sino se suministran factores de crecimiento, por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).<sup>92</sup> Otra limitación fue el corto tiempo de evaluación debido a que no contábamos con una incubadora que permitiera el recambio continuo de LCRA y mantuviera la concentración de gases necesaria.

Para disminuir los posibles sesgos que se pudieran presentar a lo largo de la investigación, los animales utilizados provenían de una población homogénea, y fueron asignados a los diferentes grupos de experimentación mediante aleatorización. Todos los animales se manipularon (pesaje, alimentación, etc) por



la misma persona durante toda la investigación, y se mantuvieron bajo las mismas condiciones ambientales para minimizar o eliminar el estrés físico y/o psicológico. Además, se utilizaron animales como controles falsos para simular el procedimiento quirúrgico de lesión, pero sin producir dicha lesión y de esta forma minimizar el impacto de variables, tales como genéticas, medioambientales, anestesia, entre otras que pudiesen afectar de manera importante los resultados de los experimentos realizados.<sup>93</sup>

Estos grupos de animales utilizados como controles se contrastaron directamente con los grupos de animales que fueron sometidos a lesión para evaluar los diferentes objetivos planteados al inicio de esta investigación.

En primera instancia, con el fin de determinar la viabilidad del cultivo organotípico agudo de corteza cerebral de rata con trauma craneoencefálico, se evaluaron diferentes aspectos que se mencionan a continuación:

En nuestro grupo, la viabilidad celular de muestras cultivadas mediante la implementación de cultivos organotípicos agudos fue evaluada inicialmente en cultivos de muestras provenientes de humanos,<sup>94</sup> las cuales se cultivaron con éxito entre 2 y 6 horas, tiempo a partir del cual la viabilidad celular, medida de forma indirecta con base en la inmunoreactividad de NeuN, decreció claramente en los posteriores tiempos de cultivo.<sup>83</sup> Este hallazgo puede atribuirse principalmente al hecho de que las muestras de humanos cultivadas provenían de sujetos con lesiones focales o contusiones, las cuales de por sí ya presentaban una alta degeneración antes del cultivo; por lo cual el tiempo de supervivencia se redujo notoriamente a diferencia de muestras que no presenten lesiones focales que puedan alterar aún más la supervivencia celular o que sean llevadas en un periodo más corto a cultivo, ralentizando así el proceso de muerte celular.

Posteriormente, nuestro grupo de investigación en un estudio ejecutado en paralelo con muestras del presente proyecto,<sup>95</sup> mediante la determinación de la función mitocondrial por citometría de flujo, pudo determinar que el porcentaje de supervivencia en células disociadas de corteza frontal de rata a las 4 horas de cultivo era del 71% en las muestras controles y del 49% en las muestras con trauma.

En el presente trabajo, para determinar la viabilidad celular de corteza cerebral de rata con trauma craneoencefálico en cultivo organotípico agudo durante todos los tiempos de cultivo definidos (0, 2, 4, 6 y 8 horas) y validar los datos ya obtenidos previamente para las 4 horas de cultivo; se implementó el ensayo por exclusión o marcación con azul de tripan, el cual es un método ampliamente utilizado por la mayoría de los laboratorios de cultivos celulares a lo largo de muchísimos años.

Los resultados obtenidos a partir de esta evaluación con azul de tripan, mostró que a las 4 horas de cultivo alrededor del 60% de células en los sujetos control y casi un 50% de células en los sujetos lesionados, siguen siendo viables en el tejido cultivado.

En esta investigación con la aplicación del método con azul de tripan, se logró validar los datos obtenidos previamente por nuestro grupo para las 4 horas de cultivo por citometría de flujo al encontrarse valores de viabilidad muy cercanos en ambos métodos. Además de esto, con este método se logró evaluar los demás tiempos de cultivo, aportando así un mayor conocimiento y validez a nuestro modelo de cultivo. Otro aspecto importante a resaltar de los datos obtenidos en este estudio, es que a las 8 horas de cultivo a pesar de presentar una notable disminución de la viabilidad celular, el 36% de células en tejido control y el 19% en tejido lesionado siguen siendo viables.

Con esta evaluación de viabilidad celular se demostró que los cultivos organotípicos agudos son una herramienta de investigación valiosa al permitir simular condiciones *in situ* conservando las estructuras durante un tiempo determinado, a su vez, se propone para futuros estudios que bajo condiciones óptimas, estos porcentajes de viabilidad encontrados podrían ser más altos en tiempos de evaluación superiores a 8 horas y así poder examinar más a fondo qué cambios patológicos ocurren después de una lesión.

A fin de describir la evolución temporal y espacial de la población neuronal en un modelo de cultivo organotípico agudo de corteza cerebral de rata con trauma craneoencefálico; se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico utilizando el Antígeno nuclear neuronal (NeuN) teniendo como referencia estudios previos realizados en el Centro de Estudios Cerebrales,<sup>94,96</sup> los reportes encontrados en la literatura y los biomodelos que sirvieron como sujetos control los cuáles fueron distribuidos de manera pareada respecto a los lesionados para cada tiempo.

Este análisis permitió por lo tanto evaluar dos aspectos principales: el primero corresponde a la identificación de la inmunoreactividad y organización laminar normal a partir de las muestras provenientes de los sujetos control, diferenciando células piramidales (células de proyección) y no-piramidales (interneuronas). El segundo aspecto importante, es la determinación de si el modelo de investigación utilizado en éste estudio (Modelo de TCE sumado a cultivo organotípico), corresponde a un método sólido en la investigación fisiopatológica y se podría considerar como una herramienta futura para investigaciones farmacológicas.

A partir de la identificación del patrón de inmunoreactividad para NeuN, se logró establecer la evolución temporal y espacial a lo largo de los diferentes tiempos de cultivo para ambos grupos post-trauma de 48 y 72 horas a partir de los sujetos control, mostrando que esta inmunoreactividad presenta un comportamiento o tendencia general a disminuir a lo largo de los diferentes tiempos de cultivo tanto

en los sujetos control como en aquellos que fueron sometidos a TCE, siendo esta disminución más marcada en los sujetos lesionados.

Esta disminución ya ha sido reportada en nuestro grupo<sup>94,96-98</sup> y por numerosos autores los cuales han descrito que las neuronas en condiciones saludables al momento de la fijación expresan una intensa IR, la cual disminuye en condiciones patológicas como isquemia cerebral, hipoxia y trauma<sup>96-99</sup>. Aunque la reducción de la marcación con el anticuerpo anti-NeuN puede, según algunos autores,<sup>100,101</sup> indicar un cambio en la antigenicidad de la proteína NeuN en lugar de la muerte celular y algunas neuronas pueden recuperar su patrón de tinción después de la reparación; se acepta que este fenómeno corresponde a lesión neuronal.

Asimismo, sólo nuestro grupo hasta ahora ha reportado una valoración cualitativa y semicuantitativa de la distribución de NeuN a través de la descripción regional de la marcación y la cuantificación de neuronas con marcación normal y anormal en regiones supragranulares e infragranulares en corteza para el modelo de Marmarou, ya que previo a ésta, la descripción del comportamiento neuronal había sido evaluado solamente para TCE focal.<sup>78</sup>

Por consiguiente, comparando los resultados obtenidos en esta investigación con lo ya realizado en nuestro grupo por Gonzalez *et al*, 2014 basado en el modelo modificado de Marmarou; se encontró una similitud en el patrón de IR de NeuN en ambas investigaciones, siendo mayor en los sujetos lesionados en el tiempo 0 (cero) a las 48 horas post-trauma respecto a sus controles y menor en los lesionados a las 72 horas post-trauma.

Además, en este estudio se logró profundizar en el análisis del comportamiento de la IR de NeuN a lo largo de diferentes tiempos de cultivo, demostrando que la IR de NeuN va decreciendo con el paso del tiempo hasta alcanzar valores de IR bajos en los sujetos lesionados, valores que son similares a los encontrados para

sujetos control. Se demostró entonces que el modelo modificado de Marmarou realizado por nuestro grupo es reproducible, dándole confiabilidad a los resultados obtenidos en ambas investigaciones.

Igualmente, con el propósito de validar la información obtenida en esta investigación, nos basamos en el Método de Tukey o Método de la Diferencia Significativa Honesta de Tukey (DSH) teniendo en cuenta las dos metodologías utilizadas para el cálculo de la IR de NeuN tanto en corteza cerebral como en hipocampo. Se observó entonces que en ambas metodologías los sujetos Control de las 48 y 72 horas, presentaron un comportamiento similar (cercano a 0) donde la variabilidad entre ellos fue mínima sin diferencias estadísticamente significativas, dándole validez y solidez al modelo utilizado (modelo de TCE sumado a cultivo organotípico agudo). (Figura 17), convirtiéndolo por lo tanto, en una buena herramienta para investigaciones fisiopatológicas y farmacológicas futuras.

Así pues, este análisis de la expresión de NeuN también se ve sustentado con los datos obtenidos en esta investigación a partir de los ensayos de viabilidad celular, considerándose por lo tanto, que la evaluación de la expresión de NeuN puede ser utilizada como una medida indirecta de sobrevivencia y/o muerte celular en cultivos organotípicos agudos.

Por otra parte, con el fin de describir los cambios temporales y espaciales en la expresión de la proteína precursora amiloide (APP) después del trauma craneoencefálico en un modelo de cultivo órganotípico agudo de corteza cerebral de rata; se realizaron ensayos de inmunohistoquímica dirigidos a los extremos amino y carboxilo de APP encontrándose que:

En los sujetos control se evidenció incremento del extremo N-terminal de APP tanto en corteza como en hipocampo, pero no se encontró expresión del extremo

C-terminal de APP en estos sujetos. Esta marcación positiva de APP N-terminal en sujetos que no fueron sometidos a TCE, puede ser atribuida al considerar el daño causado por la pérdida de conectividad debido a la sección axonal realizada con el fin de cultivar las tajadas. Este daño ha sido reportado ya anteriormente, donde se evidencia que la neurodegeneración asociada a un estímulo lesivo en cultivos organotípicos, debe interpretarse bajo el conocimiento de los factores asociados a la técnica y sus efectos; entre ellos, el grosor de corte se relaciona con Hipoxia-isquemia apareciendo dentro de las primeras 24 horas una necrosis central.<sup>34</sup> Además, esto se ve sustentado con otros estudios los cuales sugieren que la proteína precursora amiloide (APP) posee una expresión ubícua al ser una glicoproteína integral de membrana altamente conservada, al encontrarse inserta en la membrana de la mayor parte de las células del organismo; ocupando un pequeño dominio intracelular, una porción intramembranosa y un vasto dominio extracelular que flota libremente en el espacio que rodea a la célula; por lo que en sujetos control es normal encontrarla en bajas concentraciones al ser una proteína constitutiva.<sup>102,103</sup>

En otro orden, se ha reportado que un aumento agudo de APP en neuronas lesionadas y astrocitos reactivos después de TCE, está asociado con el aumento de muerte celular en el hipocampo.<sup>104</sup> Sin embargo, otros autores argumentan que las lesiones cerebrales, como isquemia o trauma, conducen a una sobre-regulación variable y acumulación de APP/A $\beta$ <sup>105 106</sup> lo cual puede representar una posible respuesta neuroprotectora a las lesiones cerebrales, mientras que la acumulación a largo plazo de los péptidos A $\beta$  tiene consecuencias negativas sobre el comportamiento.<sup>107 108 109</sup>

En sujetos lesionados, la expresión de APP N-terminal se encontró aumentada, siendo esta marcación mayor comparada con los sujetos control. Esto demuestra que el ser sometido a una lesión cerebral traumática agudiza la acumulación de APP, tal como se ha reportado previamente por otros autores.<sup>48,104</sup> Es importante

recaltar que para el extremo N-terminal se observaron picos máximos de expresión en los 4 grupos experimentales, sin embargo en los grupos A y B (TCE y Control 48 horas) el pico máximo de expresión se encontró alrededor de las 4 horas, mientras que los sujetos C y D (TCE y Control 72 horas) presentaron un pico máximo de expresión alrededor de las 2 horas de cultivo; posterior a esto, la expresión de APP N-terminal se acerca nuevamente a valores basales.

Estos picos máximos de expresión pueden corresponder a la alteración en el mecanismo de transporte y regulación de la proteína en las neuronas, las cuales expresan una mayor cantidad en estos tiempos, sin embargo, el hecho de que la expresión “regrese” a valores iniciales podría ser explicado por la expresión de APP por parte de la glía tal como se observó en nuestro grupo después de las 6 horas de cultivo en tejido humano (datos no publicados). No obstante, es importante señalar que la mayoría de los anticuerpos dirigidos contra este extremo N-terminal pueden reconocer las otras dos isoformas de APP, APP(751) y APP(770), las cuales se expresan predominantemente en células gliales, lo cual puede explicar la expresión de APP por parte de estas células.<sup>50,51 110,111</sup>

Por otro lado, para el extremo C-terminal de APP se encontró marcación en sujetos lesionados, a las 6 y 8 horas de cultivo. Debido a que el extremo C-terminal corresponde a la porción intracelular de la proteína el acceso o marcación de él es mucho más restringido a pesar de la previa permeabilización de la membrana celular (permeabilización durante el proceso de IHQ). Además de esto, se debe considerar que la mayoría de anticuerpos que existen destinados para el reconocimiento de éste extremo son específicos para el epítipo de interés, lo cual disminuye la posibilidad de marcación inespecífica o de reacción cruzada con otras proteínas o isoformas de la misma familia proteica.<sup>110</sup> Esta marcación en sujetos sometidos a TCE a las 6 y 8 horas de cultivo confirma que en condiciones normales el epítipo del extremo C-terminal, sería más difícil de detectar debido a su localización; sin embargo en una célula en proceso de muerte (como se

evidenció según los cálculos de viabilidad celular a las 6 y 8 horas) la permeabilidad de su membrana celular es mayor (sumado al proceso de permeabilización durante el proceso de IHQ), facilitando su reconocimiento y/o podría considerarse el hecho de que se presente un cambio en la conformación o exteriorización de la proteína que podría facilitar la unión del anticuerpo.

Algunos datos recientes sugieren que el extremo C-terminal de APP es prescindible y que sA $\beta$ PP $\alpha$  es suficiente para mediar las funciones fisiológicas de APP, en el aprendizaje espacial y potenciación a largo plazo.<sup>112</sup> Curiosamente, alteraciones en el sitio de escisión por  $\beta$ -secretasas (BACE 1) en ratones transgénicos, produce alteraciones graves de conducta (por ejemplo, alteraciones sensoriomotoras, déficit de memoria espacial, convulsiones). Esto también sugiere que APP es necesario para ciertos procesos fisiológicos específicos, aunque hay que tener en cuenta que BACE1 tiene varios sustratos adicionales, puede desempeñar un papel en el comportamiento.<sup>113</sup> Además se ha documentado que la diversidad funcional de APP puede surgir a partir de los diferentes fragmentos de esta, los cuales son generados como resultado de la escisión proteolítica del APP. Mientras  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas producen el A $\beta$  potencialmente tóxico, una vía no amiloidogénica impulsada por  $\alpha$ -secretasas da lugar a un fragmento amino-terminal soluble de APP (sA $\beta$ PP $\alpha$ ), el cual tiene varias funciones neuroprotectoras, neurotróficas y de adhesión celular.<sup>55</sup>

En definitiva, la utilización del modelo de Marmarou modificado más la aplicación de cultivos organotípicos agudos bajo condiciones controladas, se puede considerar como una base metodológica útil y eficiente que nos permitió evaluar los diferentes cambios que presenta APP después de una lesión cerebral traumática durante diferentes momentos. Además, este modelo podrá ser aplicado en la evaluación fisiopatológica de otras lesiones cerebrales o enfermedades neurodegenerativas, con menor cantidad de animales experimentales, creando así mismo, una ventana para posteriores intervenciones terapéuticas y



farmacológicas, como el ensayo de nuevas moléculas neuroprotectoras que puedan contrarrestar estos daños.

## 7. CONCLUSIONES

- Los cultivos organotípicos agudos, más que el pretender sostener y extender el tiempo de supervivencia de las muestras cultivadas, permiten simular condiciones *in situ* conservando las estructuras durante un tiempo determinado y así poder examinar qué cambios patológicos ocurren después de una lesión.
- El estudio muestra la consistencia y reproducibilidad de la lesión de TCE en condiciones *ex-vivo*. Además, la marcación de APP muestra una progresión similar a lo descrito *in vivo*.
- La evaluación temporal de la proteína NeuN usando el cultivo organotípico permite observar una respuesta diferencial a la lesión, por lo que puede ser considerado como un método indirecto de evaluación de muerte o pérdida neuronal comparado a lo que se observa en los sujetos control.
- El modelo de Marmarou modificado más la aplicación de cultivos organotípicos agudos bajo condiciones controladas se puede considerar como una base metodológica útil en la comprensión y generación de estrategias terapéuticas que eviten la progresión de la lesión secundaria en TCE.

## 8. PERSPECTIVAS

Como se demostró en el presente trabajo, los cultivos organotípicos agudos representan una herramienta experimental valiosa en el estudio de los cambios patológicos que ocurren después de una lesión debido a que los patrones de conexiones sinápticas dentro de las tajadas están mínimamente alterados con respecto a los patrones *in vivo* al momento de la extracción. Es por esta razón que se propone:

- Evaluación mediante la metodología implementada en esta investigación (Modelo de TCE + Cultivos organotípicos agudos) de otras patologías neurodegenerativas.
- Evaluación mediante esta metodología experimental (Modelo de TCE + Cultivos organotípicos agudos) si el incremento de APP en periodos de cultivo organotípico post-TCE agudo, es relevante en la Encefalopatía traumática crónica debido a que algunos autores han sugerido que existe relación entre el desarrollo de placas al principio (después de la sobreexpresión de APP) y la tautopatía al final, como consecuencia de la intervención de interleuquinas específicas liberadas por el sistema macrocito-microglial en los eventos agudos. Estas interleuquinas parecen limpiar las placas, las cuales eventualmente desaparecen, pero al mismo tiempo parecen promover la anormal hiperfosforilación de tau y por lo tanto el desarrollo de la Encefalopatía traumática crónica.<sup>114,115</sup>
- Evaluación futura directa de los efectos de fármacos neuroprotectores sobre mecanismos fisiopatológicos que podrían reflejar aquellos desarrollados *in situ* en trauma craneoencefálico (TCE).

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*. Jul 2007;99(1):4-9.
2. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil*. Sep-Oct 2006;21(5):375-378.
3. Moreno Lozada, Lucía S. Muertes y lesiones por accidentes de transporte, Colombia. *Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses*. 2012(1):349 - 402.
4. Berg J, Tagliaferri F, Servadei F. Cost of trauma in Europe. *Eur J Neurol*. Jun 2005;12 Suppl 1:85-90.
5. McAllister TW. Neurobiological consequences of traumatic brain injury. *Dialogues Clin Neurosci*. 2011;13(3):287-300.
6. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol*. Aug 2008;7(8):728-741.
7. Roberts GW, Allsop D, Bruton C. The occult aftermath of boxing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. May 1990;53(5):373-378.
8. Mortimer JA, van Duijn CM, Chandra V, et al. Head trauma as a risk factor for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol*. 1991;20 Suppl 2:S28-35.
9. Beaudoin ME, Poirel VJ, Krushel LA. Regulating amyloid precursor protein synthesis through an internal ribosomal entry site. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(21):6835-6847.
10. Magnoni S, Brody DL. New perspectives on amyloid-beta dynamics after acute brain injury: moving between experimental approaches and studies in the human brain. *Arch Neurol*. 2010;67(9):1068-1073.

11. Nicoll JA, Roberts GW, Graham DI. Apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with deposition of amyloid beta-protein following head injury. *Nat Med.* Feb 1995;1(2):135-137.
12. Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Murray L, Landon M, Graham DI. Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* Apr 1994;57(4):419-425.
13. Leker RR, Shohami E, Constantini S. Experimental models of head trauma. *Acta Neurochir Suppl.* 2002;83:49-54.
14. Denny-Brown D, Adams RD, et al. The pathology of injury to nerve induced by cold. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1945;4:305-323.
15. Dixon CE, Lighthall JW, Anderson TE. Physiologic, histopathologic, and cineradiographic characterization of a new fluid-percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma.* 1988;5(2):91-104.
16. McIntosh TK, Vink R, Noble L, et al. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience.* 1989;28(1):233-244.
17. Cernak I, Vink R, Zapple DN, et al. The pathobiology of moderate diffuse traumatic brain injury as identified using a new experimental model of injury in rats. *Neurobiol Dis.* Oct 2004;17(1):29-43.
18. Marmarou A, Hochwald G, Nakamura T, Tanaka K, Weaver J, Dunbar J. Brain edema resolution by CSF pathways and brain vasculature in cats. *Am J Physiol.* Aug 1994;267(2 Pt 2):H514-520.
19. Morales DM, Marklund N, Lebold D, et al. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience.* 2005;136(4):971-989.
20. Ikonomic MD, Uryu K, Abrahamson EE, et al. Alzheimer's pathology in human temporal cortex surgically excised after severe brain injury. *Exp Neurol.* Nov 2004;190(1):192-203.

21. Iwata A, Chen XH, McIntosh TK, Browne KD, Smith DH. Long-term accumulation of amyloid-beta in axons following brain trauma without persistent upregulation of amyloid precursor protein genes. *J Neuropathol Exp Neurol.* Dec 2002;61(12):1056-1068.
22. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* Feb 1994;80(2):291-300.
23. McLean A, Jr., Dikmen S, Temkin N, Wyler AR, Gale JL. Psychosocial functioning at 1 month after head injury. *Neurosurgery.* Apr 1984;14(4):393-399.
24. Buffo A, Rolando C, Ceruti S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol.* Jan 15 2010;79(2):77-89.
25. Clements JM, Cossins JA, Wells GM, et al. Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune encephalomyelitis and effects of a combined matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor-alpha inhibitor. *J Neuroimmunol.* Apr 1997;74(1-2):85-94.
26. Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci.* Dec 2005;6(12):931-944.
27. Fager N, Jaworski DM. Differential spatial distribution and temporal regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA expression during rat central nervous system development. *Mech Dev.* Nov 2000;98(1-2):105-109.
28. Irimia A, Chambers MC, Alger JR, et al. Comparison of acute and chronic traumatic brain injury using semi-automatic multimodal segmentation of MR volumes. *J Neurotrauma.* Nov 2011;28(11):2287-2306.
29. Morrison B, 3rd, Saatman KE, Meaney DF, McIntosh TK. In vitro central nervous system models of mechanically induced trauma: a review. *J Neurotrauma.* Nov 1998;15(11):911-928.

30. Plenz D, Kitai ST. Organotypic cortex-striatum-mesencephalon cultures: the nigrostriatal pathway. *Neurosci Lett*. May 17 1996;209(3):177-180.
31. Lossi L, Alasia S, Salio C, Merighi A. Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS. *Prog Neurobiol*. Aug 2009;88(4):221-245.
32. Strasser U, Fischer G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Methods*. Apr 1995;57(2):177-186.
33. Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci*. Oct 1997;20(10):471-477.
34. Noraberg J, Kristensen BW, Zimmer J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc*. Jan 1999;3(3):278-290.
35. Noraberg J, Poulsen FR, Blaabjerg M, et al. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. Aug 2005;4(4):435-452.
36. Bonde C, Noraberg J, Noer H, Zimmer J. Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. *Neuroscience*. 2005;136(3):779-794.
37. Frantseva MV, Kokarovtseva L, Naus CG, Carlen PL, MacFabe D, Perez Velazquez JL. Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury. *J Neurosci*. Feb 1 2002;22(3):644-653.
38. Morrison B, 3rd, Cater HL, Benham CD, Sundstrom LE. An in vitro model of traumatic brain injury utilising two-dimensional stretch of organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci Methods*. Jan 30 2006;150(2):192-201.

39. Loetscher PD, Rossaint J, Rossaint R, et al. Argon: neuroprotection in in vitro models of cerebral ischemia and traumatic brain injury. *Crit Care*. 2009;13(6):R206.
40. Rossaint J, Rossaint R, Weis J, Fries M, Rex S, Coburn M. Propofol: neuroprotection in an in vitro model of traumatic brain injury. *Crit Care*. 2009;13(2):R61.
41. Kristensen BW, Noraberg J, Zimmer J. Comparison of excitotoxic profiles of ATPA, AMPA, KA and NMDA in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res*. Oct 26 2001;917(1):21-44.
42. Fukuda A, Czurko A, Hida H, Muramatsu K, Lenard L, Nishino H. Appearance of deteriorated neurons on regionally different time tables in rat brain thin slices maintained in physiological condition. *Neurosci Lett*. Jan 16 1995;184(1):13-16.
43. Bruce AJ, Sakhi S, Schreiber SS, Baudry M. Development of kainic acid and N-methyl-D-aspartic acid toxicity in organotypic hippocampal cultures. *Exp Neurol*. Apr 1995;132(2):209-219.
44. Bruce AJ, Malfroy B, Baudry M. beta-Amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a synthetic catalytic free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 19 1996;93(6):2312-2316.
45. Cetra F. *Efecto de Neurotrofinas de alto peso molecular en una línea celular de moto neuronas*, Universidad de la República Uruguay; 2005.
46. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*. 2011;740:1-6.
47. Montaner Villalonga J. *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. 1ra Edición ed. Barcelona, España: ICG Marge, SL; 2007.
48. Caldwell JH, Klevanski M, Saar M, Muller UC. Roles of the amyloid precursor protein family in the peripheral nervous system. *Mech Dev*. Jun-Aug 2013;130(6-8):433-446.
49. Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*. Apr 1991;6(4):487-498.



50. Cappai R. The Function of the Amyloid Precursor Protein Family. *Abeta Peptide and Alzheimer's Disease*: Springer London; 2007:37-51.
51. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2011;4:3.
52. Lammich S, Kojro E, Postina R, et al. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 30 1999;96(7):3922-3927.
53. Zheng H, Koo EH. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener*. 2006;1:5.
54. Thinakaran G, Koo E. APP Biology, Processing and Function. *Abeta Peptide and Alzheimer's Disease* 2007:17-34.
55. Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron*. Feb 1993;10(2):243-254.
56. Suh YH, Checler F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev*. Sep 2002;54(3):469-525.
57. Hortobagyi T, Wise S, Hunt N, et al. Traumatic axonal damage in the brain can be detected using beta-APP immunohistochemistry within 35 min after head injury to human adults. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007;33(2):226-237.
58. Van Den Heuvel C, Donkin JJ, Finnie JW, et al. Downregulation of amyloid precursor protein (APP) expression following post-traumatic cyclosporin-A administration. *J Neurotrauma*. Nov 2004;21(11):1562-1572.
59. Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem*. Nov 6 2009;284(45):31052-31061.
60. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. Sep 1992;116(1):201-211.

61. Sarnat HB, Nochlin D, Born DE. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system. *Brain Dev.* Mar 1998;20(2):88-94.
62. Weyer A, Schilling K. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res.* Aug 1 2003;73(3):400-409.
63. Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res.* Feb 1 2005;79(3):295-302.
64. Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem.* Oct 1996;44(10):1167-1171.
65. Jellinger KA, Paulus W, Wrocklage C, Litvan I. Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer disease. Comparison of two retrospective autopsy cohorts with evaluation of ApoE genotype. *BMC Neurol.* Dec 18 2001;1:3.
66. Horner MD, Ferguson PL, Selassie AW, Labbate LA, Kniele K, Corrigan JD. Patterns of alcohol use 1 year after traumatic brain injury: a population-based, epidemiological study. *J Int Neuropsychol Soc.* May 2005;11(3):322-330.
67. Seel RT, Kreutzer JS, Rosenthal M, Hammond FM, Corrigan JD, Black K. Depression after traumatic brain injury: a National Institute on Disability and Rehabilitation Research Model Systems multicenter investigation. *Arch Phys Med Rehabil.* Feb 2003;84(2):177-184.
68. Holsinger T, Steffens DC, Phillips C, et al. Head injury in early adulthood and the lifetime risk of depression. *Arch Gen Psychiatry.* Jan 2002;59(1):17-22.
69. Koponen S, Taiminen T, Kurki T, et al. MRI findings and Axis I and II psychiatric disorders after traumatic brain injury: a 30-year retrospective follow-up study. *Psychiatry Res.* Apr 30 2006;146(3):263-270.

70. Achte K, Jarho L, Kyykka T, Vesterinen E. Paranoid disorders following war brain damage. Preliminary report. *Psychopathology*. 1991;24(5):309-315.
71. Teasdale TW, Engberg AW. Suicide after traumatic brain injury: a population study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Oct 2001;71(4):436-440.
72. Schneider HJ, Kreitschmann-Andermahr I, Ghigo E, Stalla GK, Agha A. Hypothalamopituitary dysfunction following traumatic brain injury and aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Jama*. Sep 26 2007;298(12):1429-1438.
73. Agha A, Thompson CJ. Anterior pituitary dysfunction following traumatic brain injury (TBI). *Clin Endocrinol (Oxf)*. May 2006;64(5):481-488.
74. Harrison-Felix CL, Whiteneck GG, Jha A, DeVivo MJ, Hammond FM, Hart DM. Mortality over four decades after traumatic brain injury rehabilitation: a retrospective cohort study. *Arch Phys Med Rehabil*. Sep 2009;90(9):1506-1513.
75. Brown AW, Leibson CL, Malec JF, Perkins PK, Diehl NN, Larson DR. Long-term survival after traumatic brain injury: a population-based analysis. *NeuroRehabilitation*. 2004;19(1):37-43.
76. Pradilla G, Vesga B, León-Sarmiento F. e-revistas. 2015.
77. Thurman DJ, Alverson C, Dunn KA, Guerrero J, Snieszek JE. Traumatic brain injury in the United States: A public health perspective. *J Head Trauma Rehabil*. Dec 1999;14(6):602-615.
78. Gonzalez D. *Evaluación de las alteraciones generadas en el tejido nervioso posterior a un trauma craneoencefálico difuso de severidad moderada*, Universidad del Valle; 2014.
79. Prieto R, Gutierrez-Gonzalez R, Pascual JM, et al. [Experimental models of traumatic brain injury]. *Neurocirugia (Astur)*. Jun 2009;20(3):225-244.
80. Altumbabic M, Peeling J, Del Bigio MR. Intracerebral hemorrhage in the rat: effects of hematoma aspiration. *Stroke*. Sep 1998;29(9):1917-1922; discussion 1922-1913.

81. Andres DS, Cerquetti D, Merello M, Stoop R. Effect of the level of consciousness at the neuronal scale in a rat model of Parkinson's disease. 2013/07/23 2013.
82. Krimer LS, Goldman-Rakic PS. An interface holding chamber for anatomical and physiological studies of living brain slices. *J Neurosci Methods*. Jul 18 1997;75(1):55-58.
83. Riascos D. *Progresión temporal de los cambios agudos de la cito y dendroarquitectura en tajadas de neocorteza derivada de contusión cerebral de humano*. Cali, Colombia: Ciencias Básicas Médicas, Universidad del Valle; 2007.
84. Muñoz E. *Evaluación de los niveles de caspasa 3 activa en cultivo organotípico agudo de tajadas cerebrales de rata derivadas de un modelo de trauma craneoencefálico difuso moderado*: Escuela de Ciencias Básicas, Universidad del Valle; 2014.
85. Zmarowski A, Beekhuijzen M, Lensen J, Emmen H. Differential performance of Wistar Han and Sprague Dawley rats in behavioral tests: differences in baseline behavior and reactivity to positive control agents. *Reprod Toxicol*. Sep 2012;34(2):192-203.
86. Markgraf CG, Kraydieh S, Prado R, Watson BD, Dietrich WD, Ginsberg MD. Comparative histopathologic consequences of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar rats. *Stroke*. Feb 1993;24(2):286-292; discussion 292-283.
87. Walberer M, Stolz E, Muller C, et al. Experimental stroke: ischaemic lesion volume and oedema formation differ among rat strains (a comparison between Wistar and Sprague-Dawley rats using MRI). *Lab Anim*. Jan 2006;40(1):1-8.
88. Cossio-Bolaños M, Gomez Campos R, Vargas Vitoria R, Hochmuller Fogaca RT, de Arruda M. [Reference curves for assessing the physical growth of male Wistar rats]. *Nutr Hosp*. Nov-Dec 2013;28(6):2151-2156.

89. Fuzik J, Gellert L, Olah G, et al. Fundamental interstrain differences in cortical activity between Wistar and Sprague-Dawley rats during global ischemia. *Neuroscience*. Jan 3 2013;228:371-381.
90. Yan EB, Johnstone VP, Alwis DS, Morganti-Kossmann MC, Rajan R. Characterising effects of impact velocity on brain and behaviour in a model of diffuse traumatic axonal injury. *Neuroscience*. Sep 17 2013;248:17-29.
91. Colbert CM. Preparation of cortical brain slices for electrophysiological recording. *Methods Mol Biol*. 2006;337:117-125.
92. Humpel C. Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*. Aug 5 2015;305:86-98.
93. Navarro J, Ramírez R, Villagrán C. Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales. 2012; <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/profesionalesSalud/investigacionSalud/cbis/manualprocedimientosanimales.pdf>.
94. Riascos D, Guzmán F, Buriticá E, Palacios M, Escobar MI, Pimienta H. Caracterización de un modelo organotípico de cultivos de neuronas corticales de humano derivadas de trauma craneoencefálico. 39. 2009-12-01 2009.
95. Guzman C. *Viabilidad del modelo organotípico agudo de corteza cerebral de rata con trauma craneoencefálico por funición mitocondrial*, Universidad del Valle; 2013.
96. Escobar MI, Guzmán F, Buriticá E, Riascos D, Villamil L, Pimienta H. Alteración de la organización laminar y de la dendroarquitectura de la corteza cerebral del humano post-trauma craneoencefálico. 39. 2009-12-01 2009.
97. Riascos D, Buriticá E, Palacios M, et al. Neurodegenerative Diversity in human cortical contusion: Histological analysis of tissue derived from decompressive craniectomy. 2014.
98. Buriticá E, Villamil L, Guzmán F, Escobar MI, García-Cairasco N, Pimienta HJ. Changes in Calcium-Binding Protein Expression in Human Cortical

Contusion Tissue. <http://dx.doi.org/10.1089/neu.2009.0894>. 2009-12-23 2009.

99. Sugawara T, Lewen A, Noshita N, Gasche Y, Chan PH. Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats. *J Neurotrauma*. Jan 2002;19(1):85-98.
100. Collombet JM, Masqueliez C, Four E, et al. Early reduction of NeuN antigenicity induced by soman poisoning in mice can be used to predict delayed neuronal degeneration in the hippocampus. *Neurosci Lett*. May 8 2006;398(3):337-342.
101. Unal-Cevik I, Kilinc M, Gursoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res*. Jul 23 2004;1015(1-2):169-174.
102. Van den Heuvel C, Blumbergs PC, Finniew JW, et al. Upregulation of amyloid precursor protein messenger RNA in response to traumatic brain injury: an ovine head impact model. *Exp Neurol*. 1999;159(2):441-450.
103. Dominique C, Didier H. *La Enfermedad de Alzheimer*. 1° ed2002.
104. Thornton E, Vink R, Blumbergs PC, Van Den Heuvel C. Soluble amyloid precursor protein alpha reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Res*. Jun 13 2006;1094(1):38-46.
105. Pierce JE, Trojanowski JQ, Graham DI, Smith DH, McIntosh TK. Immunohistochemical characterization of alterations in the distribution of amyloid precursor proteins and beta-amyloid peptide after experimental brain injury in the rat. *J Neurosci*. Feb 1 1996;16(3):1083-1090.
106. van Groen T, Puurunen K, Maki HM, Sivenius J, Jolkonen J. Transformation of diffuse beta-amyloid precursor protein and beta-amyloid deposits to plaques in the thalamus after transient occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Stroke*. Jul 2005;36(7):1551-1556.

107. Masliah E, Westland CE, Rockenstein EM, et al. Amyloid precursor proteins protect neurons of transgenic mice against acute and chronic excitotoxic injuries in vivo. *Neuroscience*. May 1997;78(1):135-146.
108. Brody DL, Holtzman DM. Morris water maze search strategy analysis in PDAPP mice before and after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol*. Feb 2006;197(2):330-340.
109. Clarke J, Thornell A, Corbett D, Soininen H, Hiltunen M, Jolkkonen J. Overexpression of APP provides neuroprotection in the absence of functional benefit following middle cerebral artery occlusion in rats. *Eur J Neurosci*. Oct 2007;26(7):1845-1852.
110. Gouras G, Takahashi R. Immunocytochemical Analysis of Amyloid Precursor Protein and Its Derivatives. In: Weiming Xia HX, ed. *Amyloid Precursor Protein: A Practical Approach* 2005:240.
111. Gentleman SM, Graham DI, Roberts GW. Molecular pathology of head trauma: altered beta APP metabolism and the aetiology of Alzheimer's disease. *Prog Brain Res*. 1993;96:237-246.
112. Ring S, Weyer SW, Kilian SB, et al. The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci*. Jul 18 2007;27(29):7817-7826.
113. Cole SL, Vassar R. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener*. 2007;2:22.
114. DeKosky ST, Blennow K, Ikonomic MD, Gandy S. Acute and chronic traumatic encephalopathies: pathogenesis and biomarkers. *Nat Rev Neurol*. Apr 2013;9(4):192-200.
115. Gandy S, Ikonomic MD, Mitsis E, et al. Chronic traumatic encephalopathy: clinical-biomarker correlations and current concepts in pathogenesis. *Mol Neurodegener*. 2014;9:37.

## ANEXO 1. PROTOCOLO ANESTESIA

Los biomodelos fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano al 4% en una cámara de anestesia, a 0.3 L/min O<sub>2</sub> y una presión positiva de 10 – 15 cm de H<sub>2</sub>O durante un periodo de 5 – 7 minutos. (Figura 26) Posterior a esto, el animal fue retirado de la cámara de anestesia y con el suministro constante de isoflurano a través de una máscara tubular en el hocico bajo respiración espontánea, se realizó la incisión en escalpo a nivel de la línea media entre bregma y lambda, exponiendo el cráneo para la adhesión del disco metálico.

Posterior a la lesión experimental, los animales permanecieron en la caja de anestesia, con iguales condiciones iniciales pero con un suministro de isoflurano al 2%, durante un periodo de 15 minutos aproximadamente. Durante los 5 minutos siguientes, y con administración de isoflurano vía máscara, se suturó la incisión.



**Figura 43.** Máquina y Cámara de anestesia. En esta cámara se lleva a cabo la inducción anestésica y posterior mantenimiento, con un suministro continuo de Isoflurano



## **ANEXO 2. PROTOCOLO MODELO DE LESIÓN**

Posterior al periodo de anestesia, se practicó una incisión en la línea media del escalpo seguido de una elevación periostal para exponer el área central de la bóveda craneal entre las suturas coronal y lambdoidea. En ésta área se fijó con adhesivo de cianoacrilato el disco metálico.

Luego y de manera muy rápida, se retiró la máscara de gases y se colocó la rata boca abajo en la espuma de tal manera que el disco metálico quedara centrado con el borde inferior del tubo por el que se dejó caer la pesa y una vez impactado el disco metálico, se procedió a retirar rápida y cuidadosamente la rata para evitar un segundo golpe.

Este procedimiento de impacto con suspensión de anestesia no tuvo una duración mayor a 15 segundos. Subsecuente a esto, se trasladó la rata de nuevo a la cámara de anestesia para brindarle mantenimiento anestésico. Finalizado este periodo, se sacó la rata de la cámara de anestesia y, administrándole los gases vía máscara, le fue retirado el disco metálico y se suturó la incisión con 3-4 puntos separados de seda 3/000, después de lo cual se le trasladó a su jaula para permitirle la recuperación de la anestesia.

El periodo de recuperación duró en promedio 10 minutos, tiempo después del cual las ratas despertaron completamente. El tiempo total de monitoreo post-lesión fue de aproximadamente 40 minutos: 20 minutos en la etapa de mantenimiento anestésico, 10 minutos en el periodo de recuperación de la anestesia, y 10 minutos de valoración cualitativa motora una vez las ratas despertaron completamente.

Finalmente las ratas fueron trasladadas al Bioterio de la Universidad del Valle donde se mantuvieron por 48 y 72 horas hasta la extracción de los cerebros.

### ANEXO 3. PROTOCOLO VIABILIDAD CELULAR

Transcurrido el tiempo de cultivo, y teniendo en cuenta la identificación de las muestras entre cultivado y no cultivado, se procedió a la disociación de las células cerebrales, cada bloque de tejido cerebral (aproximadamente 100 mg) se trasladó a una caja de Petri y cuidadosamente se extrajo la corteza cerebral del corte coronal del tejido mediante el uso de un escarpelo, luego se picó en trozos pequeños de menos de 1 mm de diámetro, con hojas de afeitar. Inmediatamente, las piezas de tejido se soplaron con cuidado dentro y fuera de una pipeta de 1 mL de 5 – 7 veces, con el fin de desprender las células del tejido, se incubó en 1 mL de Hank's Balanced Salt Solution 1X (GIBCO® HBSS) a pH 7.4 con tripsina al 0.025% (p/v) a 37°C durante 30 min. Al finalizar el tiempo de incubación, se adicionó 10 mL de HBSS para detener la reacción de la tripsina. Para el conteo, se tomaron 100 µl de la suspensión obtenida y se mezcló con 900 µl de Azul de Tripan al 0.4% en solución de NaCl al 0.85% (Lonza Biowhitaker), se mezcló bien y se incubó por 3 minutos (tiempos muy largos de exposición al colorante pueden hacer que las células vivas acaben por captar también éste)

Se adicionó al hematocitómetro, 10 µl de la solución celular con azul de tripan y se cubrió la muestra con un cubreobjetos. El recuento se realizó teniendo en cuenta las células que estaban en los recuadros divididos en 16 cuadrículas (A, B, C y D) del hematocitómetro y se tuvo en cuenta tanto las células blancas (vivas) como las azules (muertas); descartando aquellas que no estuviesen dentro de la cuadrícula de conteo. Todos los conteos para cada una de las muestras se realizaron por duplicado.

#### **ANEXO 4. PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA**

Los cortes se procesaron de manera seriada para Inmunohistoquímica en tejido flotante contra los anticuerpos descritos, usando la técnica de avidina/biotina anti-ratón y anti-conejo (Kit ABC Vectastain – Elite PK mouse y rabbit IgG, Vector Laboratories®) y revelado con diaminobencidina contrastado con níquel (Peroxidase Substrate Kit; DAB SK-4100), bajo condiciones estándar de laboratorio; el protocolo se describe a continuación:

Los tejidos se lavaron 3 veces por 10 minutos cada vez en PBS 1X; luego se incubaron por 15 minutos a Temperatura ambiente en solución para bloqueo de peroxidases endógenas (metanol al 30% y peróxido de hidrógeno al 0.3% en agua destilada) seguido de 3 lavados por 5 minutos cada vez en PBS 1X. Por 40 minutos se incubaron a Temperatura ambiente en suero de bloqueo (con suero normal de caballo o de cabra) al 1.5% y Triton X-100 al 0.5% en PBS 1X. Posteriormente, las secciones se incubaron durante 18-24 horas con el anticuerpo primario en una solución de suero de bloqueo al 1,5% y tritón al 0,5% a 4 grados Celsius. Finalizado este paso se hicieron de 3 lavados por 5 minutos cada vez en PBS 1X. Los tejidos se expusieron por 40 minutos a incubación en Biotina y, posteriormente, lavados con PBS 1X 3 veces por cinco minutos cada uno, a lo cual siguió incubación en Avidina, también durante 40 minutos. Terminado este proceso, los tejidos se lavaron nuevamente con PBS 1X y se les adicionó una solución que contenía Diaminobencidina al 4%, peróxido de hidrógeno al 2% y níquel al 2% en PBS 1X durante diferentes tiempos de reacción según el anticuerpo primario utilizado. El tejido se lavó nuevamente con PBS 1X durante 3 veces para bloquear la reacción de la diaminobencidina y se montó en placas revestidas con gelatina. Las placas se dejaron secando hasta el día siguiente y los tejidos se cubrieron con un medio de montaje (Fisher Permount Mounting Media) y se pusieron laminillas.

## ANEXO 5. COMPARACIÓN MÚLTIPLE IR NeuN 48 HORAS

Comparaciones múltiples IR NeuN - Tiempo Post-Trauma 48 Horas								
Región	Sujetos Control	Sujetos Trauma	Diferencia de medias (Ct-Tx)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		Significativo
						Límite inferior	Límite superior	
CA3	0 Horas	0 Horas	6,9179*	1.37569	.011	1.4720	12.3637	Si
	2 Horas	2 Horas	9,6547*	1.37569	.001	4.2088	15.1005	Si
	4 Horas	4 Horas	5,5340*	1.37569	.046	.0881	10.9798	Si
	6 Horas	6 Horas	6,4526*	1.37569	.018	1.0067	11.8985	Si
	8 Horas	8 Horas	2,4950	1.37569	.717	-2.9509	7.9409	No
CA1	0 Horas	0 Horas	5,5643	2.48816	.491	-4.2855	15.4140	No
	2 Horas	2 Horas	12,6412*	2.48816	.010	2.7914	22.4910	Si
	4 Horas	4 Horas	19,0909*	2.48816	.000	9.2411	28.9407	Si
	6 Horas	6 Horas	12,6457*	2.48816	.010	2.7959	22.4954	Si
	8 Horas	8 Horas	7,5549	2.48816	.184	-2.2949	17.4047	No
HILUS	0 Horas	0 Horas	2,0669	.84925	.395	-1.2950	5.4287	No
	2 Horas	2 Horas	2,3623	.84925	.258	-.9996	5.7241	No
	4 Horas	4 Horas	2,9496	.84925	.100	-.4123	6.3114	No
	6 Horas	6 Horas	3,3157	.84925	.054	-.0462	6.6776	No
	8 Horas	8 Horas	2,7062	.84925	.150	-.6557	6.0681	No
GD	0 Horas	0 Horas	3,5419	1.59224	.497	-2.7612	9.8450	No
	2 Horas	2 Horas	5,9173	1.59224	.071	-.3859	12.2204	No
	4 Horas	4 Horas	3,3454	1.59224	.562	-2.9578	9.6485	No
	6 Horas	6 Horas	3,4345	1.59224	.532	-2.8686	9.7376	No
	8 Horas	8 Horas	4,5038	1.59224	.243	-1.7993	10.8069	No
CORTEZA MOTORA LÁM. SUPRAG.	0 Horas	0 Horas	-27,0000*	5.31037	.010	-48.0219	-5.9781	Si
	2 Horas	2 Horas	-32,0000*	5.31037	.003	-53.0219	-10.9781	Si
	4 Horas	4 Horas	16,5000	5.31037	.167	-4.5219	37.5219	No
	6 Horas	6 Horas	66,5000*	5.31037	.000	45.4781	87.5219	Si
	8 Horas	8 Horas	51,0000*	5.31037	.000	29.9781	72.0219	Si
CORTEZA MOTORA LÁM. INFRAG.	0 Horas	0 Horas	-86,0000*	8.28251	.000	-118.7876	-53.2124	Si
	2 Horas	2 Horas	-19,0000	8.28251	.462	-51.7876	13.7876	No
	4 Horas	4 Horas	-10,0000	8.28251	.955	-42.7876	22.7876	No
	6 Horas	6 Horas	13,0000	8.28251	.836	-19.7876	45.7876	No
	8 Horas	8 Horas	50,0000*	8.28251	.003	17.2124	82.7876	Si
CORTEZA SENSORIAL LÁM. SUPRAG.	0 Horas	0 Horas	-14,5000	8.37556	.760	-47.6560	18.6560	No
	2 Horas	2 Horas	15,5000	8.37556	.697	-17.6560	48.6560	No
	4 Horas	4 Horas	27,0000	8.37556	.142	-6.1560	60.1560	No
	6 Horas	6 Horas	31,0000	8.37556	.072	-2.1560	64.1560	No
	8 Horas	8 Horas	53,5000*	8.37556	.002	20.3440	86.6560	Si
CORTEZA SENSORIAL LÁM. INFRAG.	0 Horas	0 Horas	3,5000	6.99643	1.000	-24.1965	31.1965	No
	2 Horas	2 Horas	-37,0000*	6.99643	.008	-64.6965	-9.3035	Si
	4 Horas	4 Horas	-5,0000	6.99643	.999	-32.6965	22.6965	No
	6 Horas	6 Horas	-6,5000	6.99643	.991	-34.1965	21.1965	No
	8 Horas	8 Horas	9,5000	6.99643	.916	-18.1965	37.1965	No

## ANEXO 6. COMPARACIÓN MÚLTIPLE IR NeuN 72 HORAS

Comparaciones múltiples IR NeuN - Tiempo Post-Trauma 72 Horas								
Región	Sujetos Control	Sujetos Trauma	Diferencia de medias (Ct-Tx)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		Significativo
						Límite inferior	Límite superior	
CA3	0 Horas	0 Horas	7.4506*	1.65789	.023	.8876	14.0136	Si
	2 Horas	2 Horas	4.6092	1.65789	.258	-1.9539	11.1722	No
	4 Horas	4 Horas	4.7549	1.65789	.230	-1.8082	11.3179	No
	6 Horas	6 Horas	5.9086	1.65789	.088	-.6545	12.4716	No
	8 Horas	8 Horas	2.9234	1.65789	.743	-3.6396	9.4864	No
CA1	0 Horas	0 Horas	5.4005	1.65273	.134	-1.1421	11.9431	No
	2 Horas	2 Horas	4.5741	1.65273	.263	-1.9685	11.1166	No
	4 Horas	4 Horas	10.1783*	1.65273	.002	3.6357	16.7208	Si
	6 Horas	6 Horas	10.7604*	1.65273	.002	4.2179	17.3030	Si
	8 Horas	8 Horas	10.2318*	1.65273	.002	3.6892	16.7743	Si
HILUS	0 Horas	0 Horas	1.9762	.58648	.116	-.3455	4.2979	No
	2 Horas	2 Horas	1.4356	.58648	.389	-.8861	3.7572	No
	4 Horas	4 Horas	2.1706	.58648	.072	-.1511	4.4923	No
	6 Horas	6 Horas	1.7461	.58648	.199	-.5756	4.0678	No
	8 Horas	8 Horas	1.0792	.58648	.703	-1.2425	3.4009	No
GD	0 Horas	0 Horas	3.3722	1.57784	.542	-2.8739	9.6183	No
	2 Horas	2 Horas	1.4096	1.57784	.993	-4.8366	7.6557	No
	4 Horas	4 Horas	3.4734	1.57784	.509	-2.7728	9.7195	No
	6 Horas	6 Horas	3.5165	1.57784	.495	-2.7296	9.7626	No
	8 Horas	8 Horas	.5874	1.57784	1.000	-5.6588	6.8335	No
CORTEZA MOTORA LÁM. SUPRAG.	0 Horas	0 Horas	-35.0000*	8.06226	.029	-66.9157	-3.0843	Si
	2 Horas	2 Horas	5.5000	8.06226	.999	-26.4157	37.4157	No
	4 Horas	4 Horas	22.5000	8.06226	.255	-9.4157	54.4157	No
	6 Horas	6 Horas	32.5000*	8.06226	.045	.5843	64.4157	Si
	8 Horas	8 Horas	39.5000*	8.06226	.013	7.5843	71.4157	Si
CORTEZA MOTORA LÁM. INFRAG.	0 Horas	0 Horas	9.5000	4.56618	.573	-8.5759	27.5759	No
	2 Horas	2 Horas	15.0000	4.56618	.131	-3.0759	33.0759	No
	4 Horas	4 Horas	19.5000*	4.56618	.032	1.4241	37.5759	Si
	6 Horas	6 Horas	31.5000*	4.56618	.001	13.4241	49.5759	Si
	8 Horas	8 Horas	26.0000*	4.56618	.005	7.9241	44.0759	Si
CORTEZA SENSORIAL LÁM. SUPRAG.	0 Horas	0 Horas	19.0000	8.50000	.491	-14.6486	52.6486	No
	2 Horas	2 Horas	20.5000	8.50000	.405	-13.1486	54.1486	No
	4 Horas	4 Horas	15.5000	8.50000	.712	-18.1486	49.1486	No
	6 Horas	6 Horas	18.0000	8.50000	.553	-15.6486	51.6486	No
	8 Horas	8 Horas	26.5000	8.50000	.165	-7.1486	60.1486	No
CORTEZA SENSORIAL LÁM. INFRAG.	0 Horas	0 Horas	27.5000*	6.34429	.029	2.3851	52.6149	Si
	2 Horas	2 Horas	28.0000*	6.34429	.026	2.8851	53.1149	Si
	4 Horas	4 Horas	7.0000	6.34429	.973	-18.1149	32.1149	No
	6 Horas	6 Horas	19.0000	6.34429	.195	-6.1149	44.1149	No
	8 Horas	8 Horas	0.0000	6.34429	1.000	-25.1149	25.1149	No


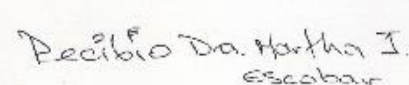
## ANEXO 7. COMPARACIÓN MÚLTIPLE IR APP N-TERMINAL 48 HORAS

Comparaciones múltiples IRAPP N-TERMINAL - Tiempo Post-Trauma a 48 Horas								
Región	Sujetos Control	Sujetos Trauma	Diferencia de medias (Ct-Tx)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		Significativo
						Límite inferior	Límite superior	
CA3	0 Horas	0 Horas	-5,6532*	1.31320	.030	-10.8517	-4.4546	Si
	2 Horas	2 Horas	-6,6060*	1.31320	.011	-11.8045	-1.4075	Si
	4 Horas	4 Horas	-28,4081*	1.31320	.000	-33.6066	-23.2095	Si
	6 Horas	6 Horas	-29,0206*	1.31320	.000	-34.2191	-23.8221	Si
	8 Horas	8 Horas	-11,9663*	1.31320	.000	-17.1648	-6.7677	Si
CA1	0 Horas	0 Horas	-14,9778*	1.25711	.000	-19.9542	-10.0013	Si
	2 Horas	2 Horas	-13,8083*	1.25711	.000	-18.7848	-8.8318	Si
	4 Horas	4 Horas	-13,5257*	1.25711	.000	-18.5022	-8.5492	Si
	6 Horas	6 Horas	-17,3547*	1.25711	.000	-22.3311	-12.3782	Si
	8 Horas	8 Horas	-14,0447*	1.25711	.000	-19.0212	-9.0682	Si
HILUS	0 Horas	0 Horas	-1.1801	.83702	.899	-4.4935	2.1334	No
	2 Horas	2 Horas	-1.2479	.83702	.869	-4.5613	2.0656	No
	4 Horas	4 Horas	-7,8446*	.83702	.000	-11.1581	-4.5312	Si
	6 Horas	6 Horas	-6,5216*	.83702	.000	-9.8351	-3.2081	Si
	8 Horas	8 Horas	-3,5960*	.83702	.031	-6.9095	-2.2826	Si
GD	0 Horas	0 Horas	-1.7820	1.32319	.919	-7.0200	3.4561	No
	2 Horas	2 Horas	-3.3935	1.32319	.338	-8.6316	1.8446	No
	4 Horas	4 Horas	-7,7758*	1.32319	.004	-13.0139	-2.5377	Si
	6 Horas	6 Horas	-5.1702	1.32319	.054	-10.4082	.0679	No
	8 Horas	8 Horas	-4.0837	1.32319	.172	-9.3218	1.1544	No
CORTEZA MOTORA LÁM. SUPRAG.	0 Horas	0 Horas	-16.5000	7.04273	.438	-44.3797	11.3797	No
	2 Horas	2 Horas	-61,5000*	7.04273	.000	-89.3797	-33.6203	Si
	4 Horas	4 Horas	-26.5000	7.04273	.066	-54.3797	1.3797	No
	6 Horas	6 Horas	-5.5000	7.04273	.997	-33.3797	22.3797	No
	8 Horas	8 Horas	-10.0000	7.04273	.895	-37.8797	17.8797	No
CORTEZA MOTORA LÁM. INFRAG.	0 Horas	0 Horas	25.0000	29.03274	.995	-89.9307	139.9307	No
	2 Horas	2 Horas	13.0000	29.03274	1.000	-101.9307	127.9307	No
	4 Horas	4 Horas	-37.5000	29.03274	.935	-152.4307	77.4307	No
	6 Horas	6 Horas	-2.0000	29.03274	1.000	-116.9307	112.9307	No
	8 Horas	8 Horas	-79.5000	29.03274	.273	-194.4307	35.4307	No
CORTEZA SENSORIAL LÁM. SUPRAG.	0 Horas	0 Horas	-8.5000	6.68207	.940	-34.9520	17.9520	No
	2 Horas	2 Horas	-20.5000	6.68207	.176	-46.9520	5.9520	No
	4 Horas	4 Horas	27,0000*	6.68207	.044	5.480	53.4520	Si
	6 Horas	6 Horas	28,5000*	6.68207	.032	2.0480	54.9520	Si
	8 Horas	8 Horas	23.0000	6.68207	.105	-3.4520	49.4520	No
CORTEZA SENSORIAL LÁM. INFRAG.	0 Horas	0 Horas	9.0000	6.29285	.892	-15.9112	33.9112	No
	2 Horas	2 Horas	-10.5000	6.29285	.791	-35.4112	14.4112	No
	4 Horas	4 Horas	41,5000*	6.29285	.001	16.5888	66.4112	Si
	6 Horas	6 Horas	53,0000*	6.29285	.000	28.0888	77.9112	Si
	8 Horas	8 Horas	9.0000	6.29285	.892	-15.9112	33.9112	No

## ANEXO 8. COMPARACIÓN MÚLTIPLE IR APP N-TERMINAL 72 HORAS

Comparaciones múltiples IRAPP N-TERMINAL - Tiempo Post-Trauma 72 Horas								
Región	Sujetos Control	Sujetos Trauma	Diferencia de medias (Ct-Tx)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		Significativo
						Límite inferior	Límite superior	
CA3	0 Horas	0 Horas	-12,1185*	2.82682	.031	-23.3090	-.9281	Si
	2 Horas	2 Horas	-22,9896*	2.82682	.000	-34.1801	-11.7992	Si
	4 Horas	4 Horas	-13,5394*	2.82682	.015	-24.7298	-2.3489	Si
	6 Horas	6 Horas	-11.0494	2.82682	.054	-22.2398	.1410	No
	8 Horas	8 Horas	-9.4819	2.82682	.118	-20.6723	1.7085	No
CA1	0 Horas	0 Horas	-14,8890*	1.51849	.000	-20.9001	-8.8778	Si
	2 Horas	2 Horas	-27,4638*	1.51849	.000	-33.4749	-21.4526	Si
	4 Horas	4 Horas	-20,4879*	1.51849	.000	-26.4991	-14.4767	Si
	6 Horas	6 Horas	-13,4337*	1.51849	.000	-19.4449	-7.4225	Si
	8 Horas	8 Horas	-3.9161	1.51849	.332	-9.9273	2.0951	No
HILUS	0 Horas	0 Horas	-3,5262*	.75944	.019	-6.5325	-.5199	Si
	2 Horas	2 Horas	-5,2182*	.75944	.001	-8.2245	-2.2118	Si
	4 Horas	4 Horas	-3,2184*	.75944	.034	-6.2247	-.2120	Si
	6 Horas	6 Horas	-1.1853	.75944	.840	-4.1916	1.8210	No
	8 Horas	8 Horas	-1.0025	.75944	.927	-4.0088	2.0038	No
GD	0 Horas	0 Horas	-12,4759*	2.15647	.004	-21.0126	-3.9391	Si
	2 Horas	2 Horas	-24,0510*	2.15647	.000	-32.5877	-15.5143	Si
	4 Horas	4 Horas	-11,7474*	2.15647	.006	-20.2841	-3.2107	Si
	6 Horas	6 Horas	-4.4637	2.15647	.579	-13.0004	4.0731	No
	8 Horas	8 Horas	-4.0605	2.15647	.680	-12.5972	4.4763	No
CORTEZA MOTORA LÁM. SUPRAG.	0 Horas	0 Horas	-39.0000	30.82856	.942	-161.0397	83.0397	No
	2 Horas	2 Horas	-39.0000	30.82856	.942	-161.0397	83.0397	No
	4 Horas	4 Horas	-2.5000	30.82856	1.000	-124.5397	119.5397	No
	6 Horas	6 Horas	7.0000	30.82856	1.000	-115.0397	129.0397	No
	8 Horas	8 Horas	-47.5000	30.82856	.849	-169.5397	74.5397	No
CORTEZA MOTORA LÁM. INFRAG.	0 Horas	0 Horas	-66.0000	29.24209	.480	-181.7594	49.7594	No
	2 Horas	2 Horas	-31.0000	29.24209	.979	-146.7594	84.7594	No
	4 Horas	4 Horas	-35.0000	29.24209	.957	-150.7594	80.7594	No
	6 Horas	6 Horas	-10.5000	29.24209	1.000	-126.2594	105.2594	No
	8 Horas	8 Horas	-65.5000	29.24209	.489	-181.2594	50.2594	No
CORTEZA SENSORIAL LÁM. SUPRAG.	0 Horas	0 Horas	-61,5000*	4.87340	.000	-80.7921	-42.2079	Si
	2 Horas	2 Horas	-63,0000*	4.87340	.000	-82.2921	-43.7079	Si
	4 Horas	4 Horas	-118,0000*	4.87340	.000	-137.2921	-98.7079	Si
	6 Horas	6 Horas	-33,0000*	4.87340	.001	-52.2921	-13.7079	Si
	8 Horas	8 Horas	-39,0000*	4.87340	.000	-58.2921	-19.7079	Si
CORTEZA SENSORIAL LÁM. INFRAG.	0 Horas	0 Horas	-15.5000	6.13188	.354	-39.7740	8.7740	No
	2 Horas	2 Horas	-28,5000*	6.13188	.019	-52.7740	-4.2260	Si
	4 Horas	4 Horas	-37,0000*	6.13188	.003	-61.2740	-12.7260	Si
	6 Horas	6 Horas	-48,0000*	6.13188	.000	-72.2740	-23.7260	Si
	8 Horas	8 Horas	-43,0000*	6.13188	.001	-67.2740	-18.7260	Si

## ANEXO 9. APROBACIÓN Y CERTIFICACIÓN - COMITÉ ÉTICA ANIMAL

 Universidad del Valle	<b>Vicedecanato de Investigaciones</b> <b>Facultad de Salud – Comité Ética Animal</b>
<b>APROBACION Y CERTIFICACION INSTITUCIONAL DEL PROYECTO</b>	
<b>TITULO "MODELO DE CULTIVO ORGANO TÍPICO AGUDO DE CEREBRO DE RATA PARA LA EVALUACION DE MEDICAMENTOS NEUROPROTECTORES EN TRAUMA CRÁNEO ENCEFÁLICO" (07-011)</b>	
<p>Presentado por los (a) profesores: Martha Escobar, Mauricio Palacios, Efraín Buritica, y la estudiante Gloria Aldana.</p>	
<p>I. Certifico que el proyecto arriba mencionado fue revisado y aprobado por el Comité de Protección Ética en Animales de la Universidad del Valle de acuerdo con los requerimientos de la Ley 84 de 1989 y (Resolución No. 8430 de 1993) del Ministerio de Salud sobre Protección de Animales y con esa garantía de cumplimiento, se aprobó en los Aspectos Éticos.</p>	
ACTA No. 001 de 2011	
 PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA (FUNCIONARIO AUTORIZADO POR LA UNIVERSIDAD DEL VALLE)	
FIRMA	FECHA: 19 10 2011
HERNÁN J. PIMENTAL	
Dirección: Vicedecanato de Investigaciones Decanato de Facultad de Salud	
Teléfono: 518 56 80 – 518 56 77	
<b>ESPACIO PARA LA ENTIDAD AUSPICIADORA</b>	
<p>II. Todas las partes de esta garantía están de acuerdo con los requerimientos para la Protección de Animales:</p>	
FIRMA: _____	
 <span style="margin-left: 50px;">FECHA: 19-10-2011.</span>	